



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2019; 33 (2): 103 - 108
http://www.fusabil.org

Mustafa GÜNDOĞAN^{1, a}
Deniz YENİ^{1, b}
Fatih AVDATEK^{1, c}

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

^a ORCID: 0000-0002-3292-4625

^b ORCID: 0000-0002-9105-5677

^c ORCID: 0000-0003-2345-8826

Merinos Irkı Koçlarda Spermaya Katılan Krosinin Dondurma ve Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametreler, Oksidatif Stres ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri*

Bu çalışmanın amacı koç sperma sulandırıcısına ilave edilen farklı dozlardaki krosinin çözüm sonu spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkilerini araştırmaktır. Ejakulatlar beş baş Merinos koçtan haftada bir kez suni vajen yardımıyla toplandı ve bu işlem altı kere tekrarlandı. Ejakulatlar ml'de 150×10^6 spermatozoon olacak şekilde antioksidan içermeyen (kontrol) ve antioksidan içeren (0.5 mM, 1 mM ve 2 mM) sulandırıcılar ile dört bölüme ayrıldı. Sulandırılan örnekler 0.25 mL'lik payetlerde 5 °C'de 3 saat ekilibrasyona tabi tutulduktan sonra sıvı azot buharında donduruldu. Çözüm sonu subjektif motilite açısından kontrol grubuna göre 0.5 mM ve 1 mM gruplarda en yüksek değerler elde edildi ($P < 0.05$). Ayrıca anormal spermatozoon oranı açısından kontrol grubuna göre 1 mM krosin içeren gruptaki azalma önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur. Host-eozin test açısından kontrol grubuna göre en yüksek değerler 1 mM grupta ($P < 0.05$) elde edildi. DNA hasarı açısından kontrol grubuna göre 0.5 mM ve 1 mM krosin içeren gruplardaki azalmalar istatistikî olarak önemli ($P < 0.05$) bulundu. Toplam oksidan statüsü, tüm antioksidan gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($P < 0.05$). Sonuç olarak yapılan çalışmada koç spermanın dondurularak saklanması spermaya katılan farklı dozlardaki krosinin 1 mM grubunun spermatozoon motilite, anormal spermatozoon oranı, HOST-Eozin test oranı, oksidatif stres ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre en iyi korumayı sağladığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Krosin, DNA hasarı, koç, sperma, dondurma, oksidatif stres

Effects of Crocin Supplementation on Spermatological Parameters, Oxidative Stress and DNA Damage After Freezing-Thawing Process in Merino Ram Semen

The aim of this study was to investigate the effects of different doses of crocin added to the extender on some spermatological parameters, oxidative stress, and DNA damage in thawed ram semen. Ejaculates were collected from five Merino rams using an artificial vagina once a week and this process was repeated six times. Ejaculates were split into four aliquots and diluted to a final concentration of 150×10^6 spermatozoa/ml with the base extender containing crocin (0.5, 1 and 2 mM) and no additive (control). All samples were cooled to 5°C and equilibrated for 3 h then were loaded into 0.25 mL straws and frozen using a liquid nitrogen vapour and plunged into the liquid nitrogen at -196°C. In the thawed semen according to subjective motility respectively 0.5 and 1mM crocin doses group indicated the highest value ($P < 0.05$). In addition, the decrease in the group containing 1 mM crocin was found to be significant ($P < 0.05$) in terms of abnormal spermatozoon ratio compared to the control group. In Host-eosin test the highest value was observed in 1mM group compared to the control group. Compared with the control group, reductions in DNA damage by 0.5 mM and 1 mM crocin were statistically significant ($P < 0.05$). Total oxidant status decreased significantly ($P < 0.05$) in all treatment groups in comparison to the control group. In conclusion, in this study, it was observed that 1 mM crocin addition to ram semen provided the best protection in motility, abnormality, membrane integrity, and DNA damage when compared to the control and other crocin doses.

Key Words: Crocin, DNA damage, ram, semen, freezing, oxidative stress

Geliş Tarihi : 03.07.2019
Kabul Tarihi : 24.09.2019

Yazışma Adresi Correspondence

Fatih AVDATEK
Afyon Kocatepe
Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni
Tohumlama Anabilim Dalı,
Afyonkarahisar – TÜRKİYE

favdatek@aku.edu.tr

Giriş

Spermatozoonların dondurulmak suretiyle canlılığının uzun yıllar muhafaza edilmesi olarak bilinen kriyopreservasyon işleminde amaç, çok düşük sıcaklıkta canlı bir hücrenin veya dokunun minimum hasarla fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır (1).

Spermanın dondurulması-çözdürülmesi esnasında oluşan membran lipid faz değişimi, ozmotik-mekanik strese ve ortamdaki serbest oksijene bağlı olarak gelişen lipid peroksidasyonu ve bunun sonucu olarak oluşan serbest oksijen radikalleri (süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit), hücre dışı kristal oluşumu, membran proteinlerindeki denaturasyon, hücre organellerinde yapısal deformasyon, DNA'da kırılmalar ve hücrelül lizis antioksidanların ilavesiyle azaltılabilmekte ve çözüm sonu

* Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 17.KARIYER.65 nolu proje ile desteklenmiştir.

spermatozoon fonksiyonlarını iyileştirmektedir (2-4). Spermanın dondurulması-çözdürülmesi, oluşan ROS ürünlerinin yarattığı oksidatif stresle ve spermatozoon membranındaki sülfidril gruplarının yeniden düzenlenmesiyle yakın ilişkilidir. Bununla beraber, sülfidril gruplarında açılmalar, miktar ve dağılımında değişimler, spermatozoonda erken kapasitasyon, spermadaki bazı antioksidan seviyelerinde düşme ve taze spermaya göre lipid peroksidasyona daha duyarlı hale gelmektedir (5-7).

Sperma sulandırıcılara katılan bazı antioksidanların kısa ve uzun süreli saklamada ortamda oluşan lipid peroksidasyonun yarattığı oksidatif hasarı minimize ettiği, canlılığı koruduğu, spermatozoonların kalitesini ve fonksiyonlarını geliştirdiği bildirilmektedir (4).

Safran, iyi bilinen antioksidan özelliklere sahip *iridaceae* ailesine ait safran çiçeğinin (*Crocus sativus* L.) kurutulmasından elde edilir. Safran İran, İspanya, İtalya, Yunanistan ve Hindistan'da yoğun olarak yetiştirilmektedir. Renk, tat ve kokusu nedeniyle bir gıda katkı maddesi olarak kullanılır. Safran geleneksel olarak şifalı bir bitki olarak değerlendirilmektedir. Araştırmalar (8-12), safranın ve aktif bileşenlerin çok çeşitli farmakolojik etkileri olduğunu göstermiştir. Safranın ve onun aktif bileşenlerinin terapötik etkileri arasında, cinsel potansiyel uyarıcı, serbest radikal süpürücüsü etkisinden dolayı antioksidan özelliği, anti-mutasyon özelliği, genetik koruma etkisi, spermatozoon morfolojisi ve motilitesine olan olumlu etkileri bulunmaktadır. Safran, infertil erkeklerde (13) ve farelerde spermatozoon morfolojisini ve motilitesini olumlu yönde etkiler. Safranın temel bileşeni olan Krosin (crocetin di-gentiobiyoz ester), doğada bulunan, serbest radikalleri, özellikle süperoksit anyonunu süpürerek bir antioksidan olarak görev yapan az sayıdaki suda çözünür karotenoidlerden biridir (14).

Safran metaboliti olan krosinde antioksidanların özel bir grubu olan karotenoidler gibi bitki türü bileşiklerden oluşur. Karotenoidlerin ROS kaynaklı birçok hastalığı (örneğin; kanser, diyabet, varikozel) azaltıp önleyebildiğine dair güçlü kanıtlar mevcuttur (15). Karotenoidler konjuge çift kenar bağların geniş bir sistemi ile donatılmıştır. Bunlar, en etkili 1O_2 süpürücülerinden biri olarak ve ayrıca hücreli lipid çift tabakalarında çalışan ROS temizleyiciler olarak düşünülmür. Dahası, karotenoidler LPO'ya karşı özel koruma sağlayabilirler (16). Ochiai ve ark. (17) serum / glukozdan yoksun Pc-12 hücrelerinin hücre zarı üzerindeki başlangıç eylemine odaklanarak krosinin nöroprotektif etkisini araştırdıkları çalışmalarında krosinin antioksidan etkisinin α -tokoferolünkinden daha güçlü olduğunu ileri sürmektedirler.

Bu araştırma aromatik bir bitki olan safranın metaboliti olan krosinin farklı oranlarda (0.5, 1 ve 2 mM) Merinos koç spermata sulandırıcısına ilave edilmesinin dondurma-çözdürme sonrası motilite, anormal spermatozoon oranları, HOST/HE test, DNA hasarı ve oksidatif stres üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezinde yetiştirilen 2-3 yaşlarındaki Merinos ırkı 5 baş koç kullanıldı. Çalışmada kullanılan koçların bakım ve beslenmesi için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin bakım ve beslenme koşullarından yararlanıldı. Çalışma süresince hayvanlara yapılan tüm müdahaleler Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda 03/05/2017 tarihli (AKÜHADYEK 195-17) referans no'lu ve 66 sayılı etik kurul onayı ile gerçekleştirildi.

Koçlardan sperma suni vajen yardımıyla alındı. Aşım sezonunda düzenli olarak koçlardan haftada bir kez alınmak üzere her bir koçtan 6 toplamda 30 ejakülat toplandı. Çalışmada sulandırıcı olarak Tris kullanılmış olup daha sonra farklı konsantrasyonlarda krosin (crocetin digentiobiose ester-17304, >%99, Sigma Aldrich Co. USA), (0.5 mM, 1 mM, 2 mM) ve herhangi bir antioksidan eklenmeyerek (kontrol) 4 farklı grup oluşturuldu. Ayrı ayrı tüplere alınan sperma örnekleri bir tüpte birleştirilerek (pooling) spermatozojik muayeneleri yapıldıktan sonra 4 eşit hacme ayrıldı. Sperma örnekleri önceden hazırlanmış %5 gliserollü farklı antioksidanlar içeren sulandırıcılarla mL'de 150×10^6 olacak şekilde dozajlanarak sulandırıldı. Sulandırma işlemini müteakiben örnekler 0.25 mL'lik farklı renklerdeki payetlere çekilerek 5 °C'de 3 saat ekilibrasyona tabi tutulduktan sonra azot buharında (~ -110 °C) 15 dk içerisinde dondurularak in vitro değerlendirmelere kadar sıvı azot içerisinde (-196 °C) depolandı.

Spermatozojik Muayeneler: Sperma motilitesi 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta (Olympus CX31, Olympus Optical Co., Ltd., Japonya) ve en az 3 alan olacak şekilde 200x ve 400x lik büyütmede değerlendirildi ve % olarak kaydedildi. Anormal spermatozoon oranı Giemsa boyama yöntemiyle boyanan slaytlar immersiyon objektif altında (100x) incelenerek çeşitli spermatozoon kısımlarına (baş, orta kısım ve kuyruk) ait bozukluklar ve bunların görülme oranları tespit edildi (18). Her slaytta 200 hücre sayıldı ve % olarak kaydedildi. Spermatozoon membran bütünlüğü ve canlılığının belirlenmesi amacıyla HOST-HE testi uygulandı (19). Sperma örneklerinin 100 mOsm/L'ye ayarlanmış HOST (sodyum sitrat-fruktoz) solüsyonu içerisine %1'lik eozin-Y ilave edildi ve 35 °C de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası froti çekilen lamalar hızlıca kurutularak hazırlandı. Hazırlanan preparatlarda toplam 200 hücre sayıldı ve spermatozoon başının boya alma ve kuyruğunun kıvrılma durumuna göre (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. Spermatozoon DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay metodu kullanıldı. Comet assay olarak da adlandırılan bu yöntemde alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda göçleri esasına dayanır.

Değerlendirmede ise elde edilen DNA migrasyon görüntülerine göre yapılmakta olup farklı aşamalardan oluşmaktadır (20, 21). Oksidatif stres parametrelerinden total antioksidan seviyesi (TAS) ve total oksidan seviyesi (TOS) Erel (22, 23)'in geliştirdiği metoda göre, numune ve ayırıcılar karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede kinetik okuma yapılarak gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz: Önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks testi ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirildi. Gruplar arası farkın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testinden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. SPSS 16.0 paket programından yararlanıldı. $P < 0.05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi.

Bulgular

Dondurma-Çözdürme Sonrası Spermatozojik Parametreler: Dondurma-çözdürme sonrası elde edilen subjektif motilite ve anormal spermatozoon oranı ile ilgili elde edilen bulgular Tablo 1'de sunulmuştur. Buna göre subjektif motilite yönünden 0.5 mM ve 1 mM krosin içeren grubun kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladığı ($P < 0.05$) gözlemlendi. Ayrıca anormal spermatozoon oranı açısından kontrol grubuna göre 1 mM krosin içeren gruptaki azalma önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-Test Parametreleri: Dondurma-çözdürme sonrası HE-test açısından elde edilen bulgular Tablo 2'de verildi. Modifiye HOS Test yönünden değerlendirildiğinde, H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre 1 mM krosin grubundaki artış, H-/E- oranı yönünden kontrol grubuna göre 2 mM krosin grubundaki azalış ve H-/E+ oranı bakımından kontrol grubuna göre 2 mM krosin grubundaki artışın önemli ($P < 0.05$) olduğu belirlendi.

Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasarları: Dondurma-çözdürme sonrası DNA hasarı yönünden elde edilen bulgular Tablo 3'de sunuldu. Buna göre kontrol grubuna göre 0.5 mM ve 1 mM krosin içeren gruplardaki azalmalar istatistikî olarak önemli ($P < 0.05$) bulundu.

Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri: Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametrelerine ait bulgular Tablo 4'de verildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, spermatozoon TAS düzeyleri bakımından, 0.5 mM ve 1 mM krosin gruplarındaki azalmalar ile TOS düzeylerine göre tüm antioksidan gruplarındaki azalma istatistikî olarak önemli ($P < 0.05$) bulundu.

Tablo 1. Dondurma-çözdürme sonrası motilite ve anormal spermatozoon oranları ($\bar{X} \pm SEM$, n:30)

Gruplar	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı			Toplam (%)
		Baş (%)	Orta Kısım (%)	Kuyruk (%)	
Kontrol	31.6 \pm 3.07 ^c	5.6 \pm 0.35	0.8 \pm 0.16 ^a	10.2 \pm 0.58 ^a	16.9 \pm 0.67 ^a
0.5 mM	43.3 \pm 3.33 ^b	5.6 \pm 0.42	0.4 \pm 0.23 ^{ab}	7.6 \pm 0.84 ^{ab}	13.7 \pm 1.37 ^{ab}
1 mM	60.0 \pm 2.58 ^a	5.8 \pm 0.42	0.1 \pm 0.16 ^b	5.5 \pm 0.53 ^b	12.4 \pm 0.78 ^b
2 mM	38.3 \pm 3.07 ^{bc}	5.8 \pm 0.82	0.1 \pm 0.10 ^b	7.3 \pm 0.85 ^a	14.3 \pm 0.81 ^{ab}
P	0.000	0.774	0.045	0.011	0.046

a-c: Her bir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir ($P < 0.05$).

Tablo 2. Dondurma-çözdürme sonrası HE-test parametreleri ($\bar{X} \pm SEM$, n: 30)

Gruplar	H+/E- (%)	H-/E- (%)	H+/E+ (%)	H-/E+ (%)
Kontrol	29.3 \pm 3.36 ^b	20.3 \pm 1.22 ^a	25.5 \pm 1.64 ^{ab}	24.8 \pm 3.86 ^b
0.5 mM	28.1 \pm 2.71 ^b	17.6 \pm 1.28 ^{ab}	26.3 \pm 1.68 ^a	27.8 \pm 2.16 ^b
1 mM	40.3 \pm 2.94 ^a	18.5 \pm 1.45 ^{ab}	21.0 \pm 2.39 ^b	20.1 \pm 2.37 ^b
2 mM	18.6 \pm 1.38 ^c	15.1 \pm 1.30 ^b	29.1 \pm 0.65 ^a	37.0 \pm 2.12 ^a
P	0.000	0.077	0.024	0.002

a-c: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî olarak önemlidir ($P < 0.05$). H+/E-; kuyruk şişmiş ve baş boya almamış, H-/E-; kuyruk şişmemiş ve baş boya almamış, H+/E+; kuyruk şişmemiş ve baş boya almış, H-/E+; kuyruk şişmiş ve baş boya almış

Tablo 3. Dondurma - çözdürme sonrası DNA Hasarları ($\bar{X} \pm SEM$, n:30)

Gruplar	DNA (AU)
Kontrol	62.3 \pm 1.85 ^a
0.5 mM	48.8 \pm 1.47 ^b
1 mM	35.8 \pm 1.77 ^c
2 mM	66.5 \pm 2.17 ^a
P	0.000

a-c: Sütun içerisinde farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir ($P < 0.05$).

Tablo 4. Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri ($\bar{X} \pm SEM$, n:30)

Gruplar	TAS (mmolTrolox Equiv./L)	TOS (μ mol hidrojenperoksit-Equiv./L)
	Kontrol	2.7 \pm 0.27 ^a
0.5 mM	2.5 \pm 0.01 ^c	6.7 \pm 0.51 ^b
1 mM	2.5 \pm 0.03 ^{bc}	5.2 \pm 0.55 ^c
2 mM	2.6 \pm 0.01 ^{ab}	5.3 \pm 0.39 ^c
P	0.001	0.000

a-c: Her bir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir ($P < 0.05$). TAS; Total antioksidan seviye, TOS; Total oksidan seviye

Tartışma

Dondurulmuş-çözdürülmüş spermada azalan antioksidan kapasite ve artan reaktif oksijen radikal oluşumu, spermatolojik özellikleri ve fertilitiyi olumsuz olarak etkiler. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma, taze spermaya göre peroksidasyona daha duyarlıdır. Son zamanlardaki araştırmalar spermanın saklanması sırasında infertiliteye yol açan en önemli sebep olarak spermatozoon membran lipidlerinin peroksidasyonunu göstermektedir. Bu nedenle koç spermasının dondurulmasında, çözündürme sonrası spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünüldüğünden, sperma sulandırıcılarına antioksidan maddeler katılmaktadır.

Çalışmada çözüm sonrası, 6 denemeden elde edilen subjektif motilite açısından 0.5 mM ve 1 mM krosin içeren gruplar kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağlayarak istatistikî açıdan önemlilik arz etmektedir ($P<0.05$). Anormal spermatozoon oranı açısından 1 mM krosin içeren grup kontrol grubuna göre olumlu etki yaparak istatistikî açıdan önemlilik arz etmektedir ($P<0.05$). Modifiye HOS Test yönünden değerlendirildiğinde, H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre 1 mM krosin grubundaki artışın önemli ($P<0.05$) olduğu belirlendi. Elde edilen veriler birçok farklı hayvan grubunda yapılan çalışmalar ile uyum içersindedir. Sapanidou ve ark. (15) boğalarda sperma sulandırıcısına farklı dozlarda krosin (0.5 mM, 1 mM ve 2mM) ilave ettikleri çalışmalarında, 1 mM ilave edilen krosinin kapasiteye ve akrozom reaksiyona giren spermatozoon yüzdesini artırdığını ve böylece spermatozoonun fertilité kapasitesine olumlu katkı yaptığını bildirmektedirler. Mata-Campuzano ve ark. (24) koç sperma sulandırıcısına 4 farklı antioksidan ilave ettikleri çalışmalarında çözüm sonu krosin ilave edilen grubun spermatolojik parametreleri koruduğunu bildirmektedirler. Mardani ve ark. (14) ratların diyetlerine günlük 100 mg/kg safran ve vitamin E ilave ettikleri çalışmalarında 60 günlük uygulama sonrası epididimal spermatozoon motilitesi, anormal spermatozoon oranını açısından kontrol grubuna göre safran ve vitamin E ilave edilen grupların daha iyi değerlere sahip olduğunu bildirmektedirler. Heidary ve ark. (13) haftada 3 kez 50 mg safranın 3 ay süreyle uygulanmasının normal insan spermatozoon morfolojisi ve motilitesini önemli derecede artırdığını ($P<0.001$) bildirmişlerdir. Dominguez-Rebolledo ve ark. (25) kırmızı geyik sperma sulandırıcısına melatonin, alfa lipoik asit, trolox ve krosin ilave ettikleri çalışmalarında çözüm sonu Trolox ve krosin'in spermatolojik parametreleri ve antioksidan sistemi koruduğunu bildirmişlerdir. In vitro koşullar altında krosinin kırmızı geyiklerde dondurma-çözündürme sonrası spermatozoon motilitesinde iyileştirici bir etkisi olduğu, bununla beraber krosinin, yardımcı üreme teknolojisi çalışmalarında koruyucu antioksidan etkisiyle spermatozoon fizyolojisini etkileyebileceği bildirilmiştir. Khazaei ve Moghbelinejad (26) normal spermatogenesis gösteren insanların sperma sulandırıcılarına 50 mg/ml safran ekstraktı ilave ettikleri çalışmalarında ekstrakt ilave edilen grubun kontrol grubuna göre dondurma çözündürme sonrası spermatozoon motilitesi, canlılığı ve

yoğunluğu açısından koruyucu etki yaptığını bildirmektedirler. Asadi ve ark. (27) 16 gün boyunca 48 saat aralıklarla intraperitoneal 1 mg/kg kadmiyum ile indüklenmiş ratlara intraperitoneal 16 gün boyunca 100 mg/kg safran enjekte ettikleri çalışmalarında uygulama sonrası safranın kadmiyumun testiküler toksisitesine karşın epididimal spermatozoon sayısını, motilitesini ve canlılığını artırdığını bu nedenle kadmiyuma maruz kalmış infertil erkeklerin tedavisinde safranın yararlı olabileceğini bildirmişlerdir. Ancak çalışmada elde edilen sonuçlar Safarinejad ve ark. (28) infertilite tanısı konmuş 260 erkekte 26 hafta boyunca yaptıkları çalışmalarında 130 kişiye günlük 60 mg/kg safran 130 kişiye ise normal diyet uyguladıkları araştırmalarında çalışma sonrası spermatozoon yoğunluğu, motilitesi ve morfolojileri ile seminal plasma oksidatif stres parametreleri yönünden gruplar arasında istatistikî bir fark olmadığını bildirdikleri çalışma ile uyum göstermemektedir.

DNA hasarı yönünden kontrol grubuna göre 0.5 mM ve 1 mM krosin içeren gruplardaki azalmalar istatistikî olarak önemli ($P<0.05$) bulundu. Yapılan bazı çalışmalarda DNA hasarı yönünden elde edilen koruyucu etkiye benzer sonuçlar alınmıştır. Premkumar ve ark. (29) farelerde farklı dozlarda safran (20, 40 ve 80 mg/kg) ile tedavinin, anti-tümör ilaçlarla indüklenen DNA hasarını önemli ölçüde azaltabileceğini bildirmektedirler. Mata-Campuzano ve ark. (24) koç sperma sulandırıcısına 4 farklı antioksidan ilave ettikleri çalışmalarında çözüm sonu krosin ilave edilen grubun DNA hasarını azalttığını bildirmektedirler. Mardani ve ark. (14) ratların diyetlerine günlük 100 mg/kg safran ve vitamin E ilave ettikleri çalışmalarında 60 günlük uygulama sonrası DNA hasarı yönünden kontrol grubuna göre safran ve vitamin E ilave edilen grupların daha iyi bir koruyucu etki gösterdiğini bildirmektedirler.

Dondurma-çözündürme sonrası oksidatif stres parametrelerine yönünden kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, spermatozoon TAS düzeyleri bakımından, 0.5 mM ve 1 mM krosin gruplarındaki azalmalar ile TOS düzeylerine göre tüm antioksidan gruplarındaki azalma istatistikî olarak önemli ($P<0.05$) bulundu. Bakhtiary ve ark. (30) haftalık 15 mg siklofosamid ile indüklenmiş farelerin diyetlerine 8 hafta boyunca günlük 200 mg/kg krosin ilave ettikleri çalışmalarında uygulama sonucunda siklofosamidin neden olduğu toksititeye karşı krosinin serbest radikalleri süpürücü etkisi ile spermatozoon kalitesini artırdığını bildirmektedirler. Tseng ve ark. (31) safran metaboliti olan krosetinin ratlarda ROS ile indüklenen hepatotoksisite ve genotoksisiteye karşı koruyucu etkiyi süperoksit anyonu ve serbest radikalleri süpürerek ortaya koyduğunu bildirmektedirler. Sapanidou ve ark. (15) boğalarda sperma sulandırıcısına farklı dozlarda krosin (0.5 mM, 1 mM ve 2mM) ilave ettikleri çalışmalarında, 1 mM ilave edilen krosinin spermatozoon hücre içi ROS seviyelerinin düşürdüğünü, MDA seviyesini azalttığını bildirmektedirler. Çalışmada tüm antioksidan gruplarda TAS düzeylerinin düşük olduğu görülmektedir. Aynı zamanda bu gruplarda TOS düzeyleri de düşmüştür. Bu durumun spermanın dondurulmasıyla beraber artan oksidan maddeleri

nötralize etmek amacıyla antioksidanların yoğun olarak kullanılmasından kaynaklanmış olabileceğini düşünüyoruz.

Sonuç olarak yapılan çalışmada koç spermasının dondurularak saklanması spermaya katılan farklı dozlardaki krosinin 1 mM grubunun spermatozoon motilite, anormal spermatozoon oranı, HE-test oranı, oksidatif stres ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre en iyi korumayı sağladığı görüldü.

Kaynaklar

1. Trounson AO. Cryopreservation. Brit Med Bull 1990; 147: 427-433.
2. Gordon IR. Artificial insemination In: Gordon IR (Editor). Reproductive Technologies in Farm Animals. USA: Cambridge, MA, 2005.
3. Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. Anim Reprod Sci 1996; 42: 55-65.
4. Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. Mol Reprod Dev 2007; 74: 878-892.
5. Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology 2001; 56: 275-286.
6. Chatterjee S, De Lamirande E, Gagnon C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. Mol Reprod Dev 2001; 60: 498-506.
7. Mazur P, Katkoo II, Katkova N, Critser JK. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an Escherichia coli membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. Cryobiology 2000; 40: 187-209.
8. Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, et al. Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. Behav Brain Res 2011; 219: 197-204.
9. Mansoori P, Akhondzadeh S, Raisi F, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety of the adjunctive saffron on sexual dysfunction induced by a selective serotonin reuptake inhibitor. J Med Plants 2011; 10: 121-130.
10. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). Exp Biol Med 2002; 227: 20-25.
11. Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. Phytother Res 2005; 19: 997-1000.
12. Tsantarliotou MP, Poutahidis T, Markala D, et al. Crocetin ameliorates endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits. Blood Coag Fibrinol 2013; 24: 305-10.
13. Heidary M, Nejadi JR, Delfan B, et al. Effect of saffron on semen parameters of infertile men. Urol J 2008; 5:55-59.
14. Mardani M, Vaez A, Razavi S. Effect of saffron on rat sperm chromatin integrity. Iran J Reprod Med 2014; 12: 343-350.
15. Sapanidou V, Taitzoglou I, Tsakmakidis I, et al. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. Theriogenology 2015; 84: 1273-1282.
16. Edge R, Mcgarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as antioxidants: a review. J Phytochem Phytobiol 1997; 41: 189-200
17. Ochiai T, Ohno SH, Soedo SH, et al. Crocin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC-12) cells by its antioxidant effect stronger than those of α -tocopherol. Neurosci Lett 2004; 362: 61-64.
18. Watson PF. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. Vet Rec 1975; 97: 12-15.
19. 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: 546-551.
20. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 1984; 123: 291-298.
21. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. Fertil. Steril 2003; 80: 1420-1430.
22. Erel Ö. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, Clin Biochem 2004; 37: 112-119.
23. Erel Ö. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, Clin Biochem 2005; 38: 1103-1111.
24. Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, et al. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. Theriogenology 2015; 83: 520-528.
25. Dominguez-Rebolledo AE, Fernandez-Santos MR, Bisbal A, et al Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. Reprod Fertil Dev 2010; 22: 856-870.
26. Khazaei Y, Moghbelinejad S. Increasing viability, numbers, and motility of sperm in men with normal spermatogenesis exposed to saffron extract after freezing-thawing process. J Qazvin Univ Med Sci 2017; 21: 12-20.

27. Asadi MH, Zafari F, Sarveazad A, Abbasi M, et al. Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. *Nephro Urol Mon* 2014; 6: e12125.
28. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. A prospective double-blind randomized placebo-controlled study of the effect of Saffron (*Crocus sativus* Linn.) on semen parameters and seminal plasma antioxidant capacity in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Phytother Res* 2011; 25: 508-516.
29. Premkumar K, Thirunavukkarasu C, Abraham S, Santhiya S, Ramesh A. Protective effect of saffron (*Crocus sativus* L.) aqueous extract against genetic damage induced by anti-tumor agents in mice. *Hum Experiment Toxicol* 2006; 25: 79-84.
30. Bakhtiary Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Zarei L. Evaluation of antioxidant effects of krosin on sperm quality in cyclophosphamide treated adult mice. *Veterinary Research Forum* 2014; 5: 213-218.
31. Tseng TH, Chu CY, Huang JM, Shiow SJ, Wang CJ. Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Cancer Letters* 1995; 97: 61-67.