



Sezon İçi ve Sezon Dışında Koç Spermasının Dondurulmasında Antioksidanların Etkisi*

Ali Doğan Ömür¹, Kenan Çoyan²

¹Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum-TÜRKİYE

²Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Denizli-TÜRKİYE

Özet: Merinos koçlardan suni vajen yardımıyla alınan ejakülatlar birleştirilerek 10 eşit hacme bölündü ve curcumin (C), ellagik asit (E) ve metiyoninin (M) 1, 2 ve 4 mM dozlarını içeren ve içermeyen (kontrol) Tris temelli sulandırıcısıyla 32°C'ta sulandırılarak 5°C'ta 3 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon sonrası sıvı azot buharında dondurulan sperma numuneleri sıvı azotta (-196°C) saklandı. Sezon içi dönemde dondurma-çözdürme sonrasında motilite oranlarına bakıldığında kontrol (%45.0 ± 5.9) grubu, antioksidan gruplarına göre daha düşük spermatozoa motilitesi oranı verdi (P<0,05). Anormal spermatozoa baş oranı açısından E 1 (%2.3 ± 0.9) en düşük değeri gösterdi. Ayrıca baş ve akrozom dışındaki diğer bölgelerde gözlenen anormal spermatozoa oranları açısından kontrol (%13.7 ± 1.0) ve M 1 (%13.8 ± 0.8) gruplarında, C 4 (%12.2 ± 0.4) ve E 4 (%12.2 ± 0.7) gruplarına nazaran önemli bir artış belirlendi (P<0,05). Sezon dışı dönemde dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın motilite oranları açısından, M 4 (%43.1 ± 3.7), M 2 (%45.6 ± 5.6), M 1 (%44.3 ± 8.2), C 4 (%43.1 ± 4.5) ve C 1 (%40.0 ± 7.5) grupları kontrol grubuna (%29.3 ± 4.9) göre daha yüksek spermatozoa motilitesi oranı verdi (P<0,05). Membran bütünlüğü (HOST) değerleri incelendiğinde C 4 (%48.1 ± 2.5) grubu, E 4 (%40.6 ± 4.1) ve kontrol (%41.2 ± 3.5) gruplarına göre yüksek sonuç verdi (P<0,05). Anormal spermatozoa baş oranları açısından M 2 (%3.0 ± 0.0) grubu en düşük oran verdi. Baş ve akrozom dışındaki diğer bölgelerdeki anormal spermatozoa oranlarına bakıldığında, kontrol (%20.0 ± 1.3) grubu, M 1 (%17.8 ± 1.1), M 2 (%17.6 ± 0.7) ve C 4 (%18.3 ± 1.1) gruplarına göre yüksek düzeyde farklı bulundu (P<0,05). Sonuç olarak, sezon içi ve dışında alınmış koç spermalarına katılan farklı antioksidanların farklı dozlarının dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın bazı spermatozojik parametreleri üzerinde olumlu etkilere sahip oldukları kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, koç sperması, spermanın dondurulması, spermatozojik parametreler

Effect of Antioxidants on Cryopreservation of Ram Semen in and out of Breeding Season

Summary: Ejaculates collected using an artificial vagina from Merino rams were pooled, then splitting into 10 equal aliquots. The aliquots were diluted in a Tris-based extender containing curcumin (C), ellagic acid (E) and methionine (M) at doses of 1, 2 and 4 mM, and no additive (control) at 32°C. Diluted samples were equilibrated at 5°C for 3h. After equilibration, the samples frozen in liquid nitrogen vapour were plunged into liquid nitrogen (-196°C) for storage. When motility rates of frozen-thawed semen collected in breeding season were considered, control group (%45.0 ± 5.9) exhibited lower motility rate than the antioxidant groups (P<0.05). Ellagic acid - E1 mM (%2.3 ± 0.9) had the lowest abnormal head structure rate (P<0.05). Furthermore, in terms of abnormal spermatozoa rates observed in other pieces of spermatozoa except for head and acrosome a significant (P <0.05) increase was determined in control (%13.7 ± 1.0) and M 1 (%13.8 ± 0.8) groups compared to those in the C 4 (%12.2 ± 0.4) and E 4 (%12.2 ± 0.7) groups. With respect to motility rates of frozen-thawed semen collected in non-breeding season, M 4 (%43.1 ± 3.7), M 2 (%45.6 ± 5.6), M 1 (%44.3 ± 8.2), C 4 (%43.1 ± 4.5) and C 1 (%40.0 ± 7.5) gave higher motility rates compared to the control group (%29.3 ± 4.9) (P<0.05). The C 4 (%48.1 ± 2.5) gave higher percentage compared to E 4 (%40.6 ± 4.1) and control (%41.2 ± 3.5) in terms of membrane integrity (HOST) values. The M 2 (%3.0 ± 0.0) had the lowest abnormal head structure rate compared to other groups (P<0.05). In terms of abnormal spermatozoa rates observed in other pieces of spermatozoa except for head and acrosome. Control group (%20.0 ± 1.3) had higher rate compared to M 1 (%17.8 ± 1.1), M 2 (%17.6 ± 0.7) and C 4 (%18.3 ± 1.1). In conclusion, it was suggested that different doses of different antioxidants added to ram semen collected in breeding and non-breeding season had positive effects on some spermatologic parameters of frozen-thawed semen.

Key Words: Antioxidant, ram semen, semen cryopreservation, spermatologic parameters

Giriş

Koç sperması dondurmaya karşı oldukça hassastır. Bu durumun temel nedeni spermatozoa membranının önemli bir kısmını doymamış yağ asitlerinin (fosfolipitler) oluşturmasıdır. Buna bağlı olarak spermatozoanın dondurulması sırasında yapılan soğutma işlemleri spermatozoa membranının geriye dönüşümü olmayan sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmakta ve membran içi enzimlerin kinetiğinde

değişimlere yol açarak çözüm sonu canlılığın azalmasına sebebiyet verdiği öne sürülmektedir (23). Diğer taraftan koç spermasının dondurulma başarısı üzerine aşım mevsiminin geçiş döneminin ve aşım mevsiminin önemli etkisinin olduğu da bildirilmiştir. Koçlarda mevsimsel değişikliklerin sperma parametreleri üzerine etkili olduğu ve dolayısıyla seminal plazmadaki spesifik proteinlerin yokluğunun ve toplam protein konsantrasyonlarındaki azalmanın donmuş spermadaki düşük motilite ile bağlantılı olabileceği (18) ayrıca sezon dışında, sezon içine göre spermatozojik parametrelerin doğal olarak optimum değerlerden sapma gösterdiği bildirilmiştir (6). Buna ek olarak yapılan çalışmalarda sezon içinde alınan koç spermasının dondurulabilme başarısının daha

Geliş Tarihi / Submission Date : 17.01.2014

Kabul Tarihi / Accepted Date : 16.04.2014

*Bu çalışmanın özeti VII. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuş ve Selçuk Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü (Proje no: 09102041) tarafından desteklenmiştir.

yüksek olduğu bildirilmiştir (16). Oksidatif stresin normal spermatozoon fonksiyonlarını bozabileceği, spermanın yüksek oksijen basıncı altında inkubasyonu ile spermatozoon motilitesinin hızlı bir şekilde azaldığının görülmesiyle ortaya konulmuştur (14). Antioksidanlar ise genel anlamda serbest radikallerin şekillenmesini inhibe ederek organizmayı zararlı etkilerinden korumakta ve bu sayede hücreler oksidatif hasara karşı vital fonksiyonlarını sürdürmektedirler (15). Koç spermasının dondurulması ve dondurulmuş spermalarla ilk suni tohumlama uygulamaları Sovyetler Birliği'nde başlamış, daha sonra Avrupa ülkelerine geçmiştir. Türkiye'de ise Cumhuriyet'in ilk yıllarında başlatılan koyun ıslahı çalışmaları günümüzde henüz istenen başarıya ulaşamamıştır (20). Bunun çeşitli nedenleri olmakla birlikte, koç spermasının dondurulmasının zorluğu ve koyunlarda suni tohumlamanın etkin yapılamaması sayılabilir. Bu nedenle araştırmacılar koç spermasının dondurma teknik ve yöntemleri üzerinde yoğunlaşmışlardır (24). Birçok araştırmacı çeşitli antioksidanları kullanarak farklı yöntemlerle koç spermasını kısa süreli saklamışlar ve dondurmuşlardır. Dondurulmuş koç spermasından döl verimini artırmak amacıyla özellikle dondurma aşamasında spermaya antioksidanlar, vitaminler ve hormonlar katılmaktadır (9). Bu çalışma dondurma-çözdürme sonrası sperm parametreleri üzerine çeşitli antioksidanların etkinliğini belirlemek amacıyla yapıldı.

Gereç ve Yöntem

2008/051 karar sayılı ve 26/06/2008 tarihli Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul kararı ile çalışmanın izni alınmıştır.

Çalışmada 2-5 yaşlı 4 baş ergin Merinos koçtan alınan ejakülatlar kullanıldı. Koçların bakım ve beslemesi Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde standart yetiştirme koşullarında yapıldı.

Ejakülatlar, aşım sezonunda (sonbahar) ve aşım sezon dışında (ilkbahar) suni vajen yardımıyla haftada iki kez, 4 hafta süresince alındı. Alınan ejakülatlardan uygun özellik (sperma yoğunluğu $\geq 3 \times 10^9$ spermatozoa/ml; motilite ≥ 80) gösterenler birleştirildi. Birleştirilen ejakülatın sulandırılmasında temel Tris sulandırıcısına (297.58mM tris, 96.32 mM sitrik asit, 82.66 mM fruktoz) %15 yumurta sarısı, gliserol %5, penisilin 500 IU/ml, streptomisin 500 IU/ml ilave edildi. Sulandırma işleminden önce curcumin ve metiyonin pH değeri 8-8.5 olan NaOH içerisinde, ellagik asit ise pH değeri 8-8.5 olan KOH içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan sulandırıcının pH'sı 6.8-7.0 olarak ayarlandı. Birleştirilen ejakülatlar 32°C'ta 10 eşit hacme bölünerek curcumin (1 miliMolar, 2 miliMolar, 4 miliMolar), ellagik asit (1 miliMolar, 2 miliMolar, 4 miliMolar), metiyonin (1 miliMolar, 2 miliMolar, 4 miliMolar) içeren ve antioksidan içermeyen (kontrol) Tris sulandırıcısıyla yaklaşık 4×10^8 spermatozoa/

ml olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırma işlemini takiben sperma numuneleri 10 dakika oda ısısında tutuldu. Ardından 0.25 ml'lik payetlere çekilerek yaklaşık 120-150 dakika +5°C'ta ekilibrasyona bırakıldı ve ekilibrasyonu izleyen süreçte sıvı azot buharında (~-120°C) 10 dakika dondurularak -196°C'taki sıvı azotta saklandı. Çalışma aşım sezonunda 8, aşım sezonu dışında 8, toplamda 16 replikasyondan oluştu. Çalışmada antioksidan içeren ve içermeyen sperma numuneleri dondurma/çözdürme sonrası spermatolojik muayenelerden spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı ve plazma membran bütünlüğü (HOST) yönüyle değerlendirildi. Dondurulmuş payetler en az 48 saat sıvı azotta bekletildi. Payetler 37°C'lık su banyosunda 30 saniye bekletilerek çözdürüldü. Spermatozoa motilite analizi için; 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopun 400x büyütmesinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 3 değişik mikroskop sahasına bakıldı. Sahalardaki motilite oranları ortalaması alınarak % motilite oranı olarak kaydedildi. Anormal spermatozoa oranı için; Hancock sıvısına alınan sperma numunesi, faz kontrast mikroskopun immersiyon objektifinde bakılarak spermatozoa anomalileri % olarak kaydedildi. Plazma membranının fonksiyonel bütünlüğünün belirlenmesi için HOS-test uygulandı. HOS-test, 300 µl 100 mOsm hipoozmotik sıvıya 30 µl sperma numunesiyle karıştırılarak 37°C'ta bir saat bekletilmesiyle yapıldı. Bu karışımdan yapılan frotide faz kontrast mikroskopun 400x büyütmesinde toplam 400 spermatozoa sayıldı, bunlardan kıvrık ve şişmiş kuyruğa sahip olanlar % olarak ifade edildi.

İstatistiki Hesaplamalar

İstatistik analizlerde farklı grupların karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi ile, aralarında önemli farklılık bulunan grupların ikili karşılaştırılması Tukey HSD ile yapıldı. İstatistik analizlerde SPSS 15.0 paket programı kullanıldı.

Bulgular

Sperma Numunelerinde Sezon İçi Dondurma-Çözdürme Sonu Bulgular

Elde edilen bulgular Tablo 1'de verildi. Plazma membran bütünlüğü ve akrozom anomalisi değerleri açısından gruplar arasında önemli bir fark gözlenmedi ($P > 0.05$). Kontrol grubu (45.0 ± 5.9) antioksidan gruplarına göre daha düşük motilite oranı gösterdi ($P < 0.05$). Anormal spermatozoa başı oranı açısından E 1 (2.3 ± 0.9), kontrol (3.6 ± 0.9)'e göre daha düşük değer gösterdi ($P < 0.05$).

Ayrıca baş ve akrozom dışındaki diğer bölgelerdeki anormal spermatozoa değerleri için C 4 (12.2 ± 0.4) ve E 4 (12.2 ± 0.7) gruplarının kontrol grubuna (13.7 ± 1.0) ve M 1 (13.8 ± 0.8)'e göre önemli ölçüde koruma sağladığı belirlendi ($P < 0.05$).

Tablo 1. Sezon içi dondurma-çözdürme sonrasında ait spermatolojik parametreler (x±SEM)

Gruplar	N	Motilite %	Host %	Anormal Spermatozoa Oranı %		
				Baş	Akrozom	Diğer
1 Kontrol	8	45.0 ± 5.9 ^b	52.5 ± 2.6	3.6 ± 0.9 ^a	2.5 ± 0.5	13.7 ± 1.0 ^a
2 M 1 mM	8	58.7 ± 8.7 ^a	54.3 ± 3.2	3.1 ± 0.3 ^{ab}	2.7 ± 0.4	13.8 ± 0.8 ^a
3 M 2 mM	8	51.2 ± 9.1 ^a	51.8 ± 2.5	3.3 ± 0.5 ^{ab}	3.0 ± 0.7	13.6 ± 1.1 ^{ab}
4 M 4 mM	8	53.1 ± 12.2 ^a	51.8 ± 3.7	3.2 ± 0.7 ^{ab}	3.1 ± 0.6	13.5 ± 0.7 ^{ab}
5 C 1 mM	8	53.7 ± 7.4 ^a	51.8 ± 4.5	2.8 ± 0.6 ^{ab}	3.0 ± 0.5	13.0 ± 1.0 ^{ab}
6 C 2 mM	8	55.0 ± 3.7 ^a	51.8 ± 2.5	2.6 ± 0.7 ^{ab}	3.3 ± 0.5	13.5 ± 0.9 ^{ab}
7 C 4 mM	8	50.6 ± 4.9 ^a	52.5 ± 2.6	2.8 ± 0.6 ^{ab}	3.1 ± 0.6	12.2 ± 0.4 ^b
8 E 1 mM	8	54.3 ± 5.6 ^a	52.5 ± 2.6	2.3 ± 0.9 ^b	3.2 ± 0.7	13.6 ± 0.9 ^{ab}
9 E 2 mM	8	56.2 ± 8.3 ^a	53.7 ± 3.5	3.0 ± 0.7 ^{ab}	2.7 ± 1.1	13.3 ± 0.7 ^{ab}
10 E 4 mM	8	54.3 ± 8.2 ^a	52.5 ± 2.6	2.8 ± 0.8 ^{ab}	3.2 ± 0.4	12.2 ± 0.7 ^b
İstatistik önem kontrolü		P<0.05	P>0.05	P<0.05	P>0.05	P<0.05

^{a,b} Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.

Sperma Numunelerinde Sezon Dışı Dondurma-Çözdürme Sonu Bulgular

Elde edilen bulgular Tablo 2'de verildi. Motilite bulgularında M 4 (%43.1 ± 3.7), M 2 (%45.6 ± 5.6), M 1 (%44.3 ± 8.2), C 4 (%43.1 ± 4.5), C 1 (%40.0 ± 7.5) grupları kontrol grubuna (%29.3 ± 4.9) göre daha yüksek motilite oranı verdi. (P<0.05). HOST değerleri incelendiğinde C 4 (%48.1 ± 2.5), kontrol (%41.2 ± 3.5) ve E 4 (%40.6 ± 4.1) gruplarına göre daha iyi membran koruyucu etkinlik gösterdi (P<0.05). Diğer

gruplar arasında HOST değerleri yönüyle anlamlı bir fark görülmedi (P>0.05). Anormal spermatozoa baş oranlarında M 2 (%3.0 ± 0.0) grubu, kontrol (%4.3 ± 0.5), C 2 (%4.0 ± 0.5), E 1 (%4.3 ± 0.5), E 2 (%4.2 ± 0.4) ve E 4 (%4.1 ± 0.8) gruplarına göre daha iyi koruma sağladı. Baş ve akrozom dışında kalan bölgelerdeki anormal spermatozoa oranlarına bakıldığında, kontrol (%20.0 ± 1.3) grubu, M 1 (%17.8 ± 1.1), M 2 (%17.6 ± 0.7) ve C 4 (%18.3 ± 1.1) gruplarına göre daha yüksek oran verdi (P<0.05).

Tablo 2. Sezon dışı dondurma-çözdürme sonrasında ait spermatolojik parametreler (x±SEM)

Gruplar	N	Motilite %	Host %	Anormal Spermatozoa Oranı %		
				Baş	Akrozom	Diğer
1 Kontrol	8	29.3 ± 4.9 ^c	41.2 ± 3.5 ^{bc}	4.3 ± 0.5 ^a	3.7 ± 0.4	20.0 ± 1.3 ^a
2 M 1 mM	8	44.3 ± 8.2 ^a	47.5 ± 5.3 ^{ab}	3.6 ± 0.5 ^{ab}	3.6 ± 0.5	17.8 ± 1.1 ^{bc}
3 M 2 mM	8	45.6 ± 5.6 ^a	47.5 ± 2.6 ^{ab}	3.0 ± 0.0 ^b	3.3 ± 0.5	17.6 ± 0.7 ^c
4 M 4 mM	8	43.1 ± 3.7 ^a	46.8 ± 4.5 ^{abc}	3.5 ± 0.5 ^{ab}	3.6 ± 0.5	18.7 ± 0.7 ^{abc}
5 C 1 mM	8	40.0 ± 7.5 ^{ab}	45.0 ± 3.7 ^{abc}	3.8 ± 0.6 ^{ab}	3.5 ± 0.7	19.1 ± 0.6 ^{abc}
6 C 2 mM	8	33.1 ± 5.3 ^{bc}	42.5 ± 2.6 ^{abc}	4.0 ± 0.5 ^a	3.8 ± 0.3	19.1 ± 0.9 ^{abc}
7 C 4 mM	8	43.1 ± 4.5 ^a	48.1 ± 2.5 ^a	3.7 ± 0.7 ^{ab}	3.3 ± 0.5	18.3 ± 1.1 ^{bc}
8 E 1 mM	8	36.2 ± 6.4 ^{abc}	41.8 ± 4.5 ^{abc}	4.3 ± 0.5 ^a	3.8 ± 0.6	18.5 ± 0.5 ^{abc}
9 E 2 mM	8	38.7 ± 4.4 ^{abc}	43.7 ± 3.5 ^{abc}	4.2 ± 0.4 ^a	3.6 ± 0.5	18.8 ± 0.8 ^{abc}
10 E 4 mM	8	36.2 ± 6.4 ^{abc}	40.6 ± 4.1 ^c	4.1 ± 0.8 ^a	4.0 ± 0.5	19.3 ± 1.4 ^{ab}
İstatistik önem kontrolü		P<0.05	P<0.05	P<0.05	P>0.05	P<0.05

^{a,b,c} Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.

Tartışma ve Sonuç

Spermatolojik parametreler üzerine etkinliği değerlendirilen antioksidanlardan curcumin, yüksek kriyoprotektif ve anioksidatif etkilerinden dolayı çeşitli hücre sistemlerini soğuk şoku ve oksidatif hasara

karşı korumaktadır (1). Bucak ve ark. (4) yaptıkları bir çalışmada Ankara keçisi spermasını curcumin (2.5, 5, 10 mM) içeren tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası 2.5 mM curcuminin % 65±3.0 motilite verdiğini belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada sezon içi dondurma-çözdürme sonrası

2 mM curcuminin %55.0±3.7 olarak verdiği motilite değeri, Bucak ve ark. (4)'nin bulunduğu 2.5 mM curcuminin %65±3.0 olarak verdiği motilite değerinden düşük bulunmuştur. Bu durum çalışmalarda kullanılan hayvan türüne, damızlık değerlerine ve kullanılan antioksidan dozuna bağlanabilir. Curcumin hücrelere hızlıca penetre olmakta ve lipofilik özelliklerinden dolayı plazma membranı gibi membranöz yapıların içinde yoğunlaşmaktadır (10). Koç spermatozoonu plazma membranının doymamış yağ asitlerinden zengin olması nedeniyle reaktif oksijen türlerinin etkilerinin oluşturduğu lipid peroksidasyonuna son derece duyarlı olduğu düşünüldüğünde, curcuminin plazma membranı içinde yoğunlaşması dolayısıyla reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerini minimize etmesi sunulan çalışmada da bu yönde etkinlik gösterdiğini düşündürmektedir. Sunulan çalışmada spermatolojik parametreler üzerine etkinliği değerlendirilen bir diğer antioksidan da metiyonindir. Metiyonin yapısında sülfür grubu taşınması nedeniyle oksidatif strese sebep olan kurşun gibi metallerle şelat oluşturabilmektedir (17). Bu durum metiyoninin oksidatif stres altındaki doku ve hücrelerin oksidasyondan korunması için antioksidan savunma sistemi olarak görev yaptığını göstermektedir (2, 19). Tuncer ve ark. (21), sezon içinde Ankara keçisi spermasını metiyonin (2.5, 5, 10 mM) içeren tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası 2.5 mM ve 5 mM metiyoninin sırasıyla % 63.6 ± 7 ve 63.4 ± 3.1 motilite oranı verdiğini belirtmişlerdir. Bucak ve ark. (4), boğa spermasını metiyonin içeren (2.5, 7.5 mM) tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası 2.5 mM metiyoninin % 41.3 ± 1.8 motilite oranı verdiğini bulmuşlardır. Sunulan çalışmada sezon içinde dondurma-çözdürme sonrası 2 mM metiyonin için elde edilen % 51.2 ± 9.1'lik motilite değeri, Bucak ve ark. (4)'nin 2.5 mM metiyonin için elde ettikleri % 41.3 ± 1.8'lik değerden yüksek, Tuncer ve ark. (21)'nin 2.5 mM metiyonin için elde ettikleri % 63.6 ± 7 oranındaki motilite değerinden ise düşük bulunmuştur. Bunun nedeni çalışmalarda kullanılan antioksidanın farklı dozlarından kaynaklanabileceği gibi, sperması değerlendirilen hayvanların türe özgü farklı spermatolojik özelliklerine sahip olması ve kullanılan sperma sulandırıcılarının içeriklerinin farklı oranlarda olması gibi faktörlere bağlanabilir. Ayrıca yapılan çalışmalardan da görüldüğü gibi antioksidanların etkilerinin spermatozoa motilitesi üzerinde gösterdiği farklı etkiler, spermanın sulandırılması ve dondurulması sırasında uygulanan protokollerden kaynaklanmış olabilir. Sunulan çalışmada kullanılan antioksidanların spermatozoa motilitesi üzerinde farklı oranlarda farklı etki göstermesi de Bucak ve ark. (4) ve Tuncer ve ark. (21)'nin çalışmalarında elde edilen bulgularla uyumluluk göstermektedir. Metiyoninin değinilen etkileri, sunulan çalışmada spermatolojik parametreler üzerinde gösterdiği antioksidatif fonksiyonunu desteklemektedir. Bu çalışmada spermatolojik

parametreler üzerine etkinliği değerlendirilen ellagik asit ise kuvvetli bir antioksidan olup doğal bitki fenolü içerir ve aynı zamanda antitümör ve antikarsinogenik özelliklere sahiptir (7). Ellagik asidin sahip olduğu fenol yapısı nedeniyle serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı savunma rolü üstlendiği düşünülmekte ve bu durum aynı zamanda ellagik asidin antioksidan özelliğiyle kriyoprotektif bir ajan olduğu görüşünü desteklemektedir. Türk ve ark. (22), ratlarda yaptıkları bir çalışmada ellagik asidin epididimal spermatozoon yoğunluğunu ve motilitesini artırdığını, anormal spermatozoon oranlarında artışa sebep olan cisplatinin etkinliğini ise azalttığını belirtmişlerdir. Benzer bir çalışmada da Çeribaşı ve ark. (5), ratlarda adriamisin epididimal sperm parametreleri üzerine gösterdiği olumsuz etkilere ve testislerde oluşturduğu lipid peroksidasyonu ve apoptozise karşı ellagik asidin koruyucu etkinlik gösterdiğini vurgulamışlardır. Ellagik asidin, adriamisin ve cisplatinin sperma hücreleri üzerindeki oksidatif stres etkinliğini azaltması, sunulan çalışmadaki etkisiyle paralellik göstermektedir. Hiposmotik şişme testi (HOST), spermatozoonun hücre zarı bütünlüğünü ve işlevselliğini ölçer. Spermatozoon membran bütünlüğü sadece metabolik faaliyetler için değil, aynı zamanda kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit yüzeyine spermatozoonun tutunma olayının gerçekleşmesinde de fonksiyonel bir öneme sahiptir. Bu nedenle membran fonksiyonunun belirlenmesi, spermatozoonun fertilizasyon kapasitesinin bir göstergesidir (11). Jeyendran ve ark. (12), yaptıkları bir çalışmada HOST sonuçları % 50-60'dan yukarı olan ejakülatları normal, %50 ve altında olan ejakülatları anormal olarak sınıflandırmışlardır. Bu çalışmada sezon içi dondurma-çözdürme sonrası gruplarda genel olarak HOST sonuçlarının % 50'den yukarı gözlenmesi, kullanılan spermanın kalitesinin yüksek olduğunu ve kullanılan antioksidanların spermatozoanın fonksiyonel membran bütünlüğünü iyileştirdiğini göstermiştir. Bu özellikteki spermatozoonların uygun tohumlama zamanında etkinlikle kullanılması, başarılı sonuçlar verebileceğini düşündürmektedir. Spermatozoonların normal formundan ayrılması fekondasyon kabiliyetinin azalmasına neden olur. Özellikle ejakülatındaki anormal spermatozoonların oranının %20'yi aşması fertilitayı olumsuz yönde etkiler. Anormal spermatozoonların genel oranı düşük olsa bile başa bağlı bozuklukların oranının %5'in, akrozoma bağlı bozuklukların oranının %10'un, proksimal sitoplazmik damlacıkların oranının %3'ün üzerinde olmaması gerekmektedir. Tuncer ve ark. (21), sezon içinde Ankara keçisi spermasını metiyonin (2.5, 5, 10 mM) içeren tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası metiyonin (2.5 mM)'in % 7.8 ± 1.3'lik oranla akrozoma bağlı anormal spermatozoa gösterdiğini bulmuşlardır. Sunulan çalışmada ise metiyonin (2 mM)'in % 3.0 ± 0.7 oranı ile akrozoma bağlı anormal spermatozoa verdiği görülmüş olup bu değer Tuncer ve ark. (21)'nin bulunduğu değerden düşük gözükmiştir. Yine Bucak ve ark. (3),

sezon içinde Ankara keçisi spermasını curcumin (2.5, 5, 10 mM) içeren tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası curcumin (2.5 mM)'in 7.8 ± 1.5 'lik oranla akrozoma bağlı anormal spermatozoa gösterdiğini bulmuşlardır. Bu çalışmada ise curcumin (2 mM)'in 3.3 ± 0.5 ile akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranı verdiği görülmüştür. Bu oran, Bucak ve ark. (3)'ünün bulduğu orandan düşük olmuştur. Yapılan başka bir çalışmada curcuminin Langerhans adacıklarında kriyoprezervasyonun sebep olduğu reaktif oksijen türlerini engellediği ve bunun da dondurma-çözdürme sonunda adacıklarda daha iyi morfolojik bütünlük sağladığı belirlenmiştir (13). Curcuminin anılan etkisi yapılan çalışmada akrozom üzerine gösterdiği koruyucu etkisiyle örtüşmektedir.

Dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametrelerde elde edilen bulgular, spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklere, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere veya analizi yapan kişiye bağlı olarak değişim göstermektedir. Tüm bu faktörlerin yanında, tür, ırk, mevsim ve birey gibi etkenler de spermatozoon motilitesi, HOST değeri ve anormal oranları üzerine önemli etkilere sahiptir.

Spermatozoonda mitokondriyel kılıf tarafından sarılan aksonem ve fibril yapıların spermatozoon motilitesi için gerekli ATP üretimini sağladığından hareketle (8), bu çalışmada sperma sulandırıcısına katılan antioksidanlardan metiyoninin spermatozoonların fonksiyonel membran yapılarını koruyarak ve dolayısıyla motiliteyi iyileştirerek etkin bir işlev gördüğü sonucu çıkartılabilir.

Sezon dışı dondurma-çözdürme sonrasında curcuminin membran bileşenlerini soğuk şoku ve oksidatif stres hasarlarından koruyarak membran bütünlüğünü sağladığı görüldü. Anormal spermatozoa başı oranlarında sezon içinde ellagik asidin, curcumin ve metiyonine göre daha iyi koruyucu etkinlik gösterdiği gözlenirken sezon dışında ise metiyoninin, curcumin ve ellagik aside göre daha iyi sonuçlar verdiği görüldü.

Sonuç olarak, farklı dönemlerde kullanılan antioksidanların ve değişen molaritelerinin, değinilen spermatolojik parametreler üzerinde farklı etkinlik gösterdiği belirlendi. Bu durum, yapılan çalışmanın antioksidanların spermatolojik parametreler üzerine spesifik etkinliğinin anlaşılabilmesi yönünde bir fikir verebilmesi açısından anlamlı olduğunu göstermiştir. Literatür taramalarında söz konusu antioksidanların spermatolojik parametrelere dair verilerine fazlaca rastlanmadığından, konuyla ilgili başka çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca yapılacak araştırmalarda in vitro muayene parametrelerinin, in vitro/vivo fertilité parametreleriyle de desteklenmesi gerekmektedir.

Teşekkür

"Sezon içi ve sezon dışında koç spermasının dondurulmasında antioksidanların etkisi" adlı tez projesinin (Proje no:09102041) yürütülmesinde bütçe desteği sağlayan S.Ü. BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Abuarqoub H, Green CJ, Foresti R, Motterlini R. Curcumin reduces cold-storage-induced damage in human cardiac myoblasts. *Exp Mol Med* 2007; 39(2): 139-48.
2. Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J* 2004; 45(5): 776-88.
3. Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, Çevik M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Rumin Res* 2010a; 89(1): 24-30.
4. Bucak MN, Tuncer PB, Sarıözkan S, Başpınar N, Taşpınar M, Çoyan K, Bilgili A, Akalın PP, Büyükleblebici S, Aydos S, Ilgaz S, Sunguroğlu A, Öztuna D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology* 2010b; 61(3): 248-53.
5. Çeribaşı AO, Sakin F, Türk G, Sönmez M, Ateşşahin A. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64(7-8): 717-24.
6. D'Alessandro AG, Martemucci G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Anim Reprod Sci* 2003; 79(1-2): 93-102.
7. Edderkaoui M, Odinkova I, Ohno I, Gukovsky I, Go VL, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14(23): 3672-80.
8. Garner DL, Hafez ESE. Spermatozoa and seminal plasma. Hafez ESE. eds. In: *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea&Febier, 1993; pp. 167-82.
9. Gökçen H, Aştı RN, Çekgöl E, Şener E. Prostaglandin F2 alfa ve Vit E katılarak dondurulan koç spermalarında akrozom morfolojisi ve dölverimi üzerinde araştırmalar. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg* 1985; 4(1): 1-3.

10. Jaruga E, Salvioli S, Dobrucki J, Chrul S, Bendorowicz-Pikula J, Sikora E, Franceschi C, Cossarizza A, Bartosz G. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. *FEBS Lett* 1998; 433 (3): 287-93.
11. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70(1): 219-28.
12. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD. The hypoosmotic swelling test: An update. *Arch Androl* 1992; 29(2): 105-16.
13. Kanitkar M, Bhonde RR. Curcumin treatment enhances islet recovery by induction of heat shock response proteins, Hsp70 and heme oxygenase-1, during cryopreservation. *Life Sci* 2008; 82(3-4): 182-9.
14. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 1943;138(1): 512-8.
15. Özata M, Yılmaz Mİ, Mergen M, Öktenli Ç, Aydın A. Erkek obezitesinde bozulmuş antioksidan kapasite ve hipoçinkonemi. *Turk J Endoc Met* 2003; (2): 47-51.
16. Öztürkler Y, Ak K, İleri İK. Koç spermasının yoğun gliserollü sulandırıcılarda dondurulması. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 1999; 25 (2): 399-414.
17. Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev* 2002; 7(1): 22-44.
18. Smith JF, Asher GW, Briggs RM, Murray GR, Morrow CJ, Oliver JE, Parr J, Veldheuzen FA, Upreti GC. Effect of diluent and storage time on pregnancy rate in ewes after intrauterine insemination. *Proc N Z Soc Anim Prod* 1993; 53(1): 295-8.
19. Stadtman ER, Van Remmen H, Richardson A, Wehr NB, Levine RL. Methionine oxidation and aging. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1703(2): 135-40.
20. Tekin N, Uysal O, Akçay E, Yavaş İ. Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2006; 53(1): 179-84.
21. Tuncer PB, Bucak MN, Sarıözkan S, Sakin F, Yeni D, Çiğerci İH, Ateşşahin A, Avdatek F, Gündoğan M, Büyükleblebici O. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (Capra hircus ancyrensis) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology* 2010; 61(1): 89-93.
22. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Çeribaşı AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril* 2008; 89 (5): 1474-81.
23. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(4): 871-91.
24. Windsor PP, Szell AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton TTB, Buchrell BC. Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1994; 42(1): 147-57.

Yazışma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Ali Doğan ÖMÜR
 Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 Dölerme ve Suni Tohumlama AD
 25240, Erzurum, Türkiye.
 Tel: +90 442 2315552; fax: +90 442 231 55 63
 e - posta: alidogan@atauni.edu.tr (Omur AD)