

## **Donmuş Boğa Spermasında Plazma Membran Sağlamlığının Morfolojik Bulgularla Karşılaştırılması**

Zekariya NUR\*

M. Kemal SOYLU\*\*

Geliş Tarihi: 23.07.2003

Kabul Tarihi: 29.09.2003

**Özet:** Hypo-ozmotik ortamda bekletilen spermanın kuyruk kısmında oluşan şişme ve kıvrılmaların hücre membranının fonksiyonel durumunun önemli bir göstergesi olduğu çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada rutin sperma analizleri ile elde edilen sonuçların Hypo-ozmotik swelling test (HOST/HOS test) ile karşılaştırılması ve bu testlerle birlikte kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Çalışmada payet metoduna göre dondurulmuş 6 baş boğanın sperması kullanıldı. Motilite ve spermatozoon morfolojisi (akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk anomalileri) ve plazma membran bütünlüğü (HOST) 37°C'lik su banyosunda 30 saniyede eritme sonrasında incelendi.

Yapılan araştırmada plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoa oranı ile motilite arasında yüksek bir korelasyon olduğu görülmüştür ( $P<0.01$ ). Membran bütünlüğüne sahip spermatozoon ile kuyruğa ait morfolojik bozukluk oranları arasında daha düşük bir korelasyon olduğu ( $P<0,05$ ), fakat akrozoma ait morfolojik bozukluk oranı ( $P>0,05$ ), başa ait morfolojik bozukluk oranı ( $P>0,05$ ) ve orta kısma ait morfolojik bozukluk oranları ( $P>0,05$ ) ile membran bütünlüğüne sahip spermatozoa oranları karşılaştırıldığında aralarında herhangi bir korelasyon olmadığı saptanmıştır.

Bu çalışmada HOST'nin basit ve uygulanabilir bir test olduğu, rutin semen analizleri ile birlikte kullanılması ile spermanın fonksiyonel bütünlüğü hakkında fikir sahibi olunabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Boğa, donmuş semen, HOST, motilite, morfoloji.

### **The Comparison of Plazma Membran Integrity with Morphological Characteristics of Frozen Bull Semen**

**Summary:** Many studies reporting that swelling of the spermatozoa after exposure to hypo-osmotic condition has been defined as an important sign of functional integrity. The objective of this study was to evaluate the relationship between the results of routine semen analyses and Hypo-osmotic swelling test (HOST/HOS test) and its usability as one of the routine tests. In the present study, straw (0.25 ml) frozen semen from 6 Holstein bulls were used. Post-thaw (37°C for 30s) motility, morphology (acrosome, head, mid piece and tail defect), and plasma membrane integrity (HOST) were determined.

A significant positive correlation was observed between motility and swollen tail spermatozoa rates ( $P<0,01$ ) and there was a correlation between tail defect and swollen tail spermatozoa rates ( $P<0,05$ ) but acrosome, head and mid piece defects were not correlated with swollen tail spermatozoa ( $P>0,05$ ).

In conclusion, the HOS test was simple and may be a useful addition to standard semen analysis for evaluation of sperm functional integrity.

**Key Words:** Bull, Frozen Semen, HOST, motility, morphology.

\* Araş.Gör.Dr. Dölerme ve Sun' i Tohumlama A.B.D. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi- Bursa.

\*\* Prof.Dr. Dölerme ve Sun' i Tohumlama A.B.D. Başk. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi- Bursa.

## Giriş

Hücre plazma membranının hipoozmotik ortama maruz bırakılması halinde ozmotik basınçlar eşitleninceye kadar su hücre içine girer. Bu su girişinden dolayı hücrenin hacmi ve hücre zarı hacmen büyür ve bunun sonucunda plazma membranında şişlikler oluşur. Spermatozoon kuyruğunun fibril kısmını kaplayan hücre zarı, baş kısmına göre daha gevşektir. Bu nedenden dolayı kuyruk kısmı diğer bölgelere göre daha bariz şekilde şişer. Kıvrılma plazma membranının şişmesinden ileri gelir. Düşük ozmotik basınca sahip ortamlarda, kimyasal ve fiziksel yönden sağlam spermatozoonun kuyruk kısmında şişmeler oluşurken, sağlam olmayan hücrelerde bu reaksiyonlar görülmez<sup>1</sup>. Jeyendran ve ark.<sup>13</sup>, ilk olarak 1984 yılında HOS testini insan spermasının değerlendirilmesinde kullanmıştır. Daha sonraki yıllarda da sığır<sup>8,9,21</sup>, köpek<sup>14</sup>, domuz<sup>23</sup>, koç<sup>22</sup> ve aygır<sup>4,15,16</sup> gibi bazı evcil memelilerin spermalarının değerlendirilmesinde kullanılabilirliği hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Yoğunluk, morfoloji ve motilite gibi standart sperma değerlendirme testleri fertilitate hakkında bir fikir vermektedir. Ancak spermatozoonun fizyolojik bütünlüğünün bir göstergesi olan hücrenin hareket şekli, spermanın dişi kanalda ilerleme gücü ve hücrenin donma yeteneği gibi testler mutlaka dikkate alınmalıdır. Spermanın potansiyel fertilitatesini belirlemeye yönelik çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Ne var ki düzenli kontrollerin yapılamaması, spermanın mikrobik kontaminasyonunun önüne geçilememesi ve teknik imkansızlıktan ileri gelen bir çok nedenler, testlerin hatalı pozitif veya hatalı negatif sonuç vermesine neden olabilmektedir. Genelde spermanın potansiyel dölleme gücünün belirlenmesi amacıyla insan hekimliğinde kullanılan spermatozoonun zonasız hamster yumurtasına penetre olma gücünün irdelendiği "Zona-Free Hamster Ova Testi" ve spermatozoon membranının fonksiyon testi olan "Hipoozmotik Şişme Testi" kullanılmaktadır<sup>11</sup>.

Foote<sup>10</sup>, erkek damızlık materyalin fertilitate yeteneğinin belirlenmesinde; spermatozoon konsantrasyonu, ejakulatta bulunan toplam hücre sayısı, spermatozoon motilitesi, ileriye doğru hareketin hızı, ölü-canlı oranı, akrozom ve diğer morfolojik bütünlüğün değerlendirilmesinin yanı sıra, DNA kalitesi, enzimatik aktivite, ozmotik stres testleri (HOST), inkübasyon testleri (viabilite), artırılmış akrozom reaksiyon oranı,

mukus veya jel penetrasyon testi, hamster yumurta penetrasyon testi ve heterospermik tohumlama testlerinin de uygulandığını bildirmiştir.

Bu çalışmada HOST'inin donmuş sığır spermasının değerlendirilmesinde kullanılan motilite ve bazı morfolojik özelliklerle olan ilişkisi ve rutin olarak bu testlerle beraber kullanılabilirliği araştırıldı.

## Materyal ve Metot

Çalışmada, 0,25ml'lik payette payette  $20 \times 10^6$  motil olacak şekilde laiciphos ile sulandırılarak dondurulmuş altı boğaya ait sperma kullanıldı. Dondurulmuş payetler  $37^\circ\text{C}$ 'da 30 saniyede eritildi. Eritme sonrası spermatozoon motilitesi, morfolojisi ve hipo-ozmotik şişme testleri yardımıyla hücre zarı fonksiyonu incelendi.

**Motilite:** Sperma eritildikten sonra ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta 400 büyütmede göreceli olarak motilite incelemeleri yapıldı<sup>12</sup>.

**Morfolojik Muayeneler:** Morfolojik muayene için Hancock solüsyonundan yararlanıldı<sup>12</sup>. Bir damla eritilmiş sperma  $37^\circ\text{C}$  ısıdaki Hancock solüsyonu içine damlatılarak tespit edildi. Tespit edilmiş spermadan bir damla örnek aktarılacak lam üzerine damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparat faz kontrast mikroskopta 1000 büyütmede incelendi. Morfolojik bozukluklar; akrozoma ait bozukluklar, başa ait morfolojik bozukluklar, orta kısma ait morfolojik bozukluklar ve kuyruğa ait morfolojik bozukluklar olmak üzere dört ana kısımda incelendi. Her preparat için toplam 200 hücre sayıldı ve yüzde oranları kaydedildi<sup>12</sup>.

**Plazma Membran Bütünlük Testi (HOST):** HOST için ilk önce 100 mOsm'lik sodyum sitrat-fruktoz hipotonik solüsyonu hazırlandı<sup>8,9</sup>.

Mikropipet yardımı ile eritilmiş spermadan 20 µl alındı ve içinde vücut ısısında 1 ml HOST medyumu bulunan tüplere aktarılacak  $37^\circ\text{C}$ 'a ayarlı su banyosunda 1 saat bekletildikten sonra HOST incelemeleri yapıldı. İnkübasyon sonrası lam üzerine bir damla örnek aktarılacak üzeri lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparat faz kontrast mikroskopta 1000 büyütmede incelendi<sup>8,9</sup>.

İncelemelerde kuyruk kısmı şişmiş olan hücreler değerlendirildi. Her preparattan toplam 200 hücre sayılarak yüzde değerleri kaydedildi<sup>12</sup>.

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde boğalar arasındaki ilişki için varyans analizi (SPSS 10,0 ANOVA) yapıldı. Motilite, akrozom, baş, orta kısım ve kuyruğa ait morfolojik bozukluklar ile plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoa oranları arasında korelasyona testi yapıldı.

## Bulgular

Plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoa oranı ile incelenen sperma parametreleri arasındaki ilişki Tablo I'de sunulmuştur.

Yapılan araştırmada plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoa oranı ile motilite arasında yüksek bir korelasyon olduğu görülmüştür ( $r=0,588$   $P<0,01$ ). Membran bütünlüğüne sahip spermatozoa ile kuyruğa ait morfolojik bozuklukların oranları arasında daha düşük bir korelasyon olduğu ( $r=0,211$   $P<0,05$ ) saptanmıştır. Fakat akrozom ( $r=0,11$   $P>0,05$ ), baş ( $r=-0,39$   $P>0,05$ ) ve orta kısma ait morfolojik bozukluk oranları ( $r=0,142$   $P>0,05$ ) ile membran bütünlüğüne sahip spermatozoa oranları karşılaştırıldığında aralarında herhangi bir korelasyon olmadığı bulunmuştur.

İncelenen bütün parametreler yönünden boğalar arasındaki varyans analiz sonuçları Tablo 2 de verilmiştir. Yapılan bu çalışmada, motilite ( $P<0,001$ ), akrozoma ait bozukluk oranı ( $P<0,01$ ), başa ait bozukluk oranı ( $P<0,001$ ), orta kısma ait bozukluk oranı ( $P<0,001$ ), kuyruk kısmına ait bozukluk oranı ( $P<0,01$ ) ve membran bütünlüğüne sahip spermatozoa oranları ( $P<0,001$ ) bakımından boğalar arasında istatistiksel fark olduğu görüldü.

**Tablo I. İncelenen sperm parametreler ile plazma membran bütünlüğü (HOST) arasındaki ilişki n=138**

**Table I. Relationship between studied sperm parameters and plazma membrane integrity**

Özellik	r	Önemlilik
HOST ile Motilite	0,588	**
HOST ile Akrozom bozukluğu	0,110	ÖD
HOST ile Baş bozukluğu	-0,139	ÖD
HOST ile Orta kısım bozukluğu	0,142	ÖD
HOST ile Kuyruk bozukluğu	0,211*	*

\*  $P<0,05$

\*\*  $P<0,01$

ÖD  $P>0,05$

**Tablo II. Boğaların incelenen parametreler yönünden boğalar arasındaki varyans analiz sonuçları (ANOVA)**

**Table II. Relationship among bulls in terms of studied semen parameters (ANOVA)**

	df	F	Önemlilik
Motilite	5	26,949	***
Akrozom bozukluğu	5	3,305	**
Baş bozukluğu	5	9,884	***
Orta kısım bozukluğu	5	8,108	***
Kuyruk bozukluğu	5	3,583	**
Plazma membran bütünlüğü	5	10,440	***

\*\*  $P<0,01$ . \*\*\*  $P<0,001$ .

df: serbestlik derecesi

F: Kareler ortalaması

## Tartışma ve Sonuç

Vital veya floresan gibi değişik boyalar kullanılarak spermatozoanın membran bütünlüğü farklı yöntemlerle belirlenebilir. Fakat HOST'in basit olması ve membran bütünlüğü hakkında bilgi vermesi yanında spermatozoon zarından su ve madde alışverişinin fizyolojik olarak normal olup olmadığını hakkında da bilgi verir<sup>19</sup>. HOST insan hekimliğinde rutin olarak spermasının zar ve fonksiyonel bütünlüğünü hakkında bilgi edinmek için güvenle kullanılmaktadır. Hafez<sup>11</sup>, HOST'un spermanın fonksiyonel bütünlüğünü ölçmede için kullanılabileceğini, ancak hatalı negatif veya hatalı pozitif sonuçların önüne geçebilmek için diğer spermatolojik testlerle bir arada değerlendirilmesi gerektiğini bildirmiştir.

Kumi-Diaka<sup>14</sup>, köpek, Ming-Huei ve ark.<sup>18</sup> ve Bedfoed ve Hoskins<sup>3</sup>, ise insan spermasında yaptıkları çalışmada taze sperma motilitesi ile HOST'inin sonuçları arasında sıkı bir ilişki olduğunu, bu sıkı ilişkinin eritme sonrasında görülmeyişini bildirmişlerdir.

Neild ve ark.<sup>19</sup>, taze ve eritilmiş aygır spermasını fruktoz, sukroz, laktoz ve 300, 150, 100, 50 ve 25 mOsm sodyum sitrat solüsyonlarda inkübe etmişler, inkübasyon sonunda fruktoz, sukroz ve laktoz içeren medyumların 100, 50 ve 25 mOsm'de en yüksek oranda şişme olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar, taze ve donmuş spermada motilite, normal spermatozoon sayısı ile HOST arasında korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Boğa spermasında in-vitro fertilizasyon

yeteneği ile HOST arasındaki ilişkiyi inceleyen Rota ve ark.<sup>21</sup>, eritme, density gradient ve kapasitasyon sonrası spermayı 5 dakika süreyle 100 mOsm fruktoz/sodyum sitrat HOST medyumunda inkübe etmişlerdir. Işık mikroskopunda 200 hücre sayarak test sonucunu değerlendiren araştırmacılar, HOS testinin tek başına sperma kalitesi hakkında yeterli bir fikir verebileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada HOST ile akrozom, baş, orta ve kuyruğa bağlı anomali bozukluklar arasında ise her hangi bir ilişki saptanmamıştır (Tablo I). Bu bulgu HOST sonuçları ile sperm morfolojisi ile sıkı bir ilişkisi olmadığını bildiren çalışmalarla benzerdir<sup>3,14,18</sup>.

Vazquez ve ark.<sup>23</sup>, domuz sperması kullanarak HOS testinin kullanılabilirliğini ve bu metodun diğer spermatolojik testlerle ilişkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, spermayı fruktoz Na-sitrat içeren 50, 100, 150, 200 mOsm/L solüsyon içinde 37°C'a 30-120 dakika arasında değişik sürelerde inkübe etmişlerdir. Aynı araştırmacılar HOST sonuçlarının tekrarlı incelemelerde de %8 gibi bir dalgalanma gösterdiğini, en fazla HOST pozitif sonucun 30 dakikalık inkübasyonda saptadığını, daha fazla bekletmenin sonuçları etkilemediğini, 200 mOsm de inkübasyon'da elde edilen sonuçların oldukça düşük (P<0.05) olmasına karşın 50 ve 100 mOsm/L'de elde edilen sonuçların birbirine benzediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar eozin Y ve carboxylfluorescein diacetate sonuçlarının birbirine benzediğini, HOST sonuçlarının ise daha düşük sonuçlar verdiğini, HOST testinin domuz spermasının değerlendirilmesinde kullanılabilirliğini açıklamışlardır.

HOST ile motilite ve morfoloji arasında da korelasyonun bulunduğu çoğu araştırmacı tarafından bildirilmiştir<sup>1,5-9,15,17,19</sup>. Yaptığımız çalışmada da eritme sonrası HOST verileri ile motilite arasında yüksek bir korelasyon bulunmuştur (Tablo I).

Sonuç olarak, HOST ile motilite arasında sıkı bir ilişki olduğu, ancak diğer morfolojik bulgular ile bir ilişkisinin olmadığı saptanmıştır. HOS testinin ucuz, basit ve kolay uygulanabileceği, spermatozoon membranının fonksiyon yeteneği arasında sıkı bir ilişki bulunduğu, standart sperma testleri ile uygulanması ile spermanın fonksiyonel yapısı hakkında önemli ek bir fikir edinilebileceği kanısına varılmıştır.

## Kaynaklar

1. AHMADI, A., SOON-CHYE N.G. The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 1992; 68:346-350.
2. BAHAMONDES, L., FAZANO, F., DE LUCIO, M.A., NEVES, P.A., BOTTOCHER LUIZ, F., LORENZETTI, G.B. Evaluation of human sperm membrane integrity using the watter test and the hypoosmotic test. *Andrologia* 2001; 33,75-77.
3. BEDFOED, J.M., HOSKINS, D.D. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology in Lamming, G.E. (ed) *Marshall's Physiology of Reproduction*. 4. ed. Churchill Livingstone Edinburg London Melbourne and New York 379-568, 1990.
4. BORG, K., COLENBRANDER, B., FAZELI, A., PARLEVLIET, J., MALMGREN, L. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1997; 48: 531-536.
5. BUCKET, M. W., FARGUHARSON, R. G., LUCKAS, M. J. M., KINGSLAND, C. R., AIRD, I. A., LEWIS-JONES, D. I. The hypoosmotic swelling test in recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility* 1997; 68: 506-509.
6. CALAMERA, J.C., DONCEL, G.F., BRUGO OLMEDO, S., KOLM, P., ACOSTA, A.A. Modified sperm stress test: A simple assay that predicts sperm-related abnormal in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 1998; 13: 2484-2488.
7. CHRISTENSEN, P., BROCKHOFF, P.B., LEHN-JENSEN, H. The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 1999; 34: 503-507.
8. CORREA, J.A., HEERSCH, G., ZAVOS, P.M. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology* 1997; 47: 715-729.
9. CORREA, J. R., PACE, M.M., ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 1997; 48: 721-731.
10. FOOTE, R.H. Preservation and fertility of spermatozoa. 11.th Intern. Cong. Anim. Reprod. And A. İ., Dublin, 1988; Abstracts Book, 127-134.
11. HAFEZ, E. S. E. Semen evaluation in Hafez, E. S. E. (ed) *Reproduction in farm animals*. 6. ed. Lea and Fabiger, Philadelphia, 405-423, 1993.

12. İLERİ, İ.K., AK, K., PABUÇÇUOĞLU, S., BIRLER, S. Reprodüksiyon ve sun'i Tohumlama. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Yayını. Ders Notu No: 23, 2000.
13. JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M., CRABO, B.G., ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 1984; 70: 219-228.
14. KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the Hypo-osmotic test. *Theriogenology* 1993; 39: 1279-1289.
15. LAGARES, M.A., PETZOLDT, R., SIEME, H., KLUG, E. Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia* 2000; 32: 163-167.
16. LIN, M.-H., MORSHEDI, M., SRISOMBUT, C., NASSAR, A., OEHNINGER, S. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the Water test, and eosin-Y staining. *Fertility and Sterility* 1998; 70: 6148-155.
17. LIU, Z., FOOTE, R.H. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying osmolarity. *J. Dairy Sci.* 1998; 81: 1868-1873.
18. MING-HUEI, L., MAHMOOD, M., CHARTCHAI, S., AHMED, N., SERGIO, O. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and the eosin-Y staining. *Fertility and Sterility*. 1998; 70: 1148-1155.
19. NEILD, D., CHAVES, G., FLORES, M., MORA, N., BECONI, M., AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51: 721-727.
20. NEILD, D.M., CHAVES, M.G., FLORES, M., MIRAGAYA, H.M., GONZALES, E., AGÜERO, A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 2000; 32, 351-355.
21. ROTA, A., PENZO, N., VINCENTI, L., MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 2000; 53: 1415-1420.
22. SÖDERQUIST, L., MADRID-BURY, N., RODRIQUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 1991; 48: 1115-1125.
23. VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., MARTINEZ, P., GARCIA-ARTIGA, C, ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology* 1997; 47: 913-922.