



Araştırma Makalesi

## Farklı Antioksidanlarla Kısa Süreli Saklanılan Kıvrıkcık Koç Spermasının *In Vitro* ve *In Vivo* Değerlendirilmesi

Ahmet Ceylan, Melih Aksoy, İlker Serin, Niyazi Küçük, Uğur Uçan, Ejaz Ahmed, Zahed Naseer

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama, 09016 Aydın, Türkiye

### Ö Z E T

**Öz bilgi/Amaç:** Spermanın kısa süreli saklanması sırasında lipid peroksidasyona maruz kalabilmekte ve bunun sonucu olarak da spermatozoon motilitesinde, membran bütünlüğünde kayıplar ve fertilité oranlarında düşmeler yaşanmaktadır. Spermatozoon meydana gelen bu tarz değişiklikler, spermatozoon membran fosfolipitlerinde gelişen lipid peroksidasyonu ve bunun sonucu olarak ortaya çıkan serbest oksijen radikallerin oluşturduğu yıkımlara bağlı olabilmektedir. Sperma, ortamda gelişen lipid peroksidasyonunu dengelemek ve serbest radikallerin aşırı üretimini/salınımını önlemek için bazı antioksidanları içermektedir. Ancak, spermadaki endojen antioksidatif kapasite spermanın kısa süreli saklanması yeterli gelmemektedir. Sunulan çalışmada, koç spermasının 5°C'de kısa süreli saklanması sulandırıcıya butylated hydroxytoluene (BHT) ve trehaloz ilavesinin spermatozoonlar üzerine koruyucu etkisinin ve bu spermatozoonlarla yapılan tohumlamalardan elde edilecek gebelik oranlarının araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada toplam 3 baş Kıvrıkcık ırkı koç ve bu koçlardan suni vajen kullanılarak toplanan ejakülatlar kullanıldı. Alınan ejakülatlar birleştirildikten sonra 3 eşit parçaya bölündü. Sonra her bir bölüm tris-citric acid-glucose (TCG), TCG+trehaloz (50 mM) veya TCG+BHT (0,6 mM) içeren sulandırıcılar ile sulandırıldı. Yaklaşık ml'de 200×106 spermatozoa olacak şekilde sulandırılan sperma numuneleri 0.25 ml lik payetlere çekilerek 5°C'de kısa süreli saklandı. Daha sonra sperma örneklerinde 0., 24., 48 ve 72. saatlerde spermatozoa motilitesi, canlı ve anormal spermatozoon oranları, spermatozoon membran bütünlüğü ile akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranlarının belirlenmesi için muayeneler gerçekleştirildi.

**Bulgular ve Sonuç:** Yapılan muayeneler sonucu ortalama motilite, canlı spermatozoon oranı, spermatozoon membran bütünlüğü ve akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel değerlendirmede önemli farklılıklar bulunmadı. Ancak, en düşük anormal spermatozoon oranları 72. saat sonunda trehaloz grubunda elde edilirken, en yüksek anormal spermatozoon oranı kontrol grubunda tespit edilmiştir. 0 ve 24. saatlerde Trehaloz ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı (P<0.05). 5°C 24 saat muhafaza edilen sperma örnekleriyle laparoskopik yöntemle intrauterin olarak yapılan tohumlamalardan elde edilen gebelik oranları BHT grubunda %50, trehaloz grubunda %20 ve kontrol grubunda ise %40 olarak belirlendi. BHT'nin trehaloz ve kontrol grubuna göre gebelik oranları üzerine sayısal olarak olumlu bir katkı sağladığı gözlenmekle birlikte gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, koç spermasının kısa süreli saklanması sulandırıcıya eklenen trehalozun sadece anormal spermatozoon oranının düşük kalmasında önemli katkı sağladığı belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Koç, sperma, kısa süreli saklama, antioksidan, fertilité.

## In vitro and In vivo Evaluation of Kıvrıkcık Ram Semen Stored Short-Term with Different Antioxidants

### ABSTRACT

**Background/Aim:** The sperm cells may undergo lipid peroxidation during the liquid storage and, thus, sperm motility, membrane integrity and fertility rates may drop down. These reductions in sperm parameters may be related to the lipid peroxidation which occurs in phospholipids in plasma membrane by means of oxidative stress byproducts, free oxygen radicals. Normally, sperm cells contain antioxidants to balance lipid peroxidation or to overcome excessive production of free radicals. However, these antioxidant potential is not enough during the liquid storage of spermatozoa. The objective of the present study was to investigate the effect of butylated hydroxytoluene (BHT) and trehalose supplementation of the extender on different parameters and pregnancy rates to be obtained from inseminations of ram spermatozoa short term stored at 5°C.

**Material and Method:** Three Kıvrıkcık rams were used as sperm donors. The semen samples were collected using artificial vagina during the study. After collection, ejaculates were pooled and divided into three aliquots. The aliquots were diluted in tris-citric acid-glucose (TCG) extender with or without 0.6 mM BHT or 50 mM trehalose to a final concentration of 200 x 106 sperm/ml. Extended ejaculates were then loaded into 0.25 ml straws, cooled and stored at 5°C. Motility, sperm membrane integrity, percentage of live, abnormal and acrosome reacted sperm cells were estimated 0, 24, 48 and 72 hours after cooling.

**Results and Conclusion:** After estimation all these parameters, there was no significant differences between groups. However, the highest abnormal sperm rate was obtained from control group while the lowest abnormal sperm rate was obtained from trehalose group end of the 72 hours cooling. Percentage of abnormal sperm cells was significantly less in trehalose group as compared to control group before cooling and 24 hours after cooling (P<0.05). After the sperm samples were stored at 5°C for 24 hours, sperm samples were used for laparoscopic insemination. After inseminations, pregnancy rates were determined in BHT, trehalose and control groups (% 50, % 20, and % 40 respectively). The results of present study showed that pregnancy rate was numerically higher in BHT group compared to trehalose and control groups but there was no significant difference between groups. In conclusion, trehalose supplementation was found beneficial to maintain abnormal sperm rate in low level during short term storage of semen.

**Keywords:** Ram, semen, short term storage, antioxidants, fertility.

## Giriş

Spermanın kısa süreli saklanması sırasında hücreler lipid peroksidasyona maruz kalabilmekte ve bunun sonucu olarak da spermatozoon motilitesinde ve membran bütünlüğünde kayıplar ve fertilité oranlarında düşmeler yaşanmaktadır (Salamon ve Maxwell, 2000). Spermatozoonda meydana gelen bu tarz değişiklikler, spermatozoon membran fosfolipitlerinde gelişen lipid peroksidasyonu ve bunun sonucu olarak ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin (ROS) oluşturduğu yıkımlara bağlı olabilmektedir (Aitken ve Baker, 2004).

Memeli spermatozoası serbest radikallerin membran lipidlerini okside etmesi sonucu şekillenen lipid peroksidasyonuna oldukça duyarlıdır. Toksik serbest radikaller spermatozoada fiziksel ve kimyasal hasarlar oluşturarak yaşlanmasına neden olmaktadır (Aitken ve Baker, 2004; Jones ve ark., 1979). Antioksidanlar, serbest radikallerin uyardığı oksidatif strese karşı spermatozoanın savunmasında rol alırlar. Hücre sel antioksidan mekanizması, pek çok doku ve sekresyonunda bulunmaktadır (Aitken ve Baker, 2004). Bir kısmı ROS üretimini engelleyerek, bir kısmı da mevcut ROS' u yok ederek etki göstermektedir (Agarwal ve ark., 2005). ROS'un zarar verici etkisine karşı spermatozoa ve seminal plazma antioksidatif savunma sistemlerine sahiptir. Ancak, spermatozoanın küçük sitoplazmasına bağlı olarak antioksidatif savunma sistemleri kısıtlıdır (Aurich ve ark., 1997). Seminal plazmada doğal olarak bulunan veya bulunmayan taurin, hypotaurin, inositol, prolin, süperoksit dismutaz, katalaz, piruvat, glutatyon, ergotiyonin, trehaloz, BHT, desferal, askorbik asit, alfa-tokoferol gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir. Bu amaçla çeşitli antioksidanlar sperma sulandırıcılarına katılarak spermaların kısa ve uzun süreli saklanmasında kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Maxwell ve Stojanov, 1996; Aurich ve ark., 1997; Baumber ve ark., 2000; Ijaz ve ark., 1995; Yıldız ve Daşkın, 2004; Lopez-Saaz ve ark., 2000; Bucak ve Tekin, 2007).

Antioksidan bileşiklerin etki şekli ve etkinlik düzeyi oldukça farklıdır. Genelde antioksidanlar, reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasar almış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı veya yenilenmesi gibi oldukça farklı etki şekillerinden birini veya bir kaçını ortaya koyarlar. İdeal bir antioksidan bilinen bu etki şekillerinden birçoğunu yerine getirebilme özelliğine sahiptir (Chen ve ark., 2003).

Bu çalışmada, sulandırıcıya katılan BHT ve trehaloz ilavesinin koç spermatozoonlarının +5°C' de kısa süreli saklanması sırasında koruyucu etkisi ve bu spermatozoonlarla yapılan tohumlamalardan elde edilecek gebelik oranlarının araştırılması amaçlandı.

## Materyal ve Metot

### Hayvan Materyali

Bu çalışmada sperma vericisi olarak fertilitesi bilinen ve genital organ muayenesi sonucunda herhangi bir patolojiye rastlanmayan toplam 3 baş Kıvrık ırkı koç ve yine bu koçlardan toplanan ve antioksidan ilaveli sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların fertilité düzeylerinin belirlenmesi amacıyla toplam 39 baş koyun kullanıldı. Sünger uygulanan koyunlardan 4'ünün süngerleri düştüğünden ve 5'nin de östrus göstermediğinden araştırmaya 30 koyun dahil edildi. Araştırma sırasında kullanılacak koç ve koyunların bakımı ve barındırılması Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi bünyesinde yer alan koyun padoklarında standart yetiştirme koşullarında yapıldı. Çalışmanın sperma alma, sulandırma, 5°C muhafazası ve spermatozoon muayene aşaması Şubat ve Mayıs aylarını

kapsayan 4 aylık bir dönemde gerçekleştirildi. Koyunların senkronizasyonu ve suni tohumlama çalışmaları ve gebelik muayeneleri ise Mayıs-Haziran ayları arasında gerçekleştirildi.

### Spermanın alınması ve sulandırılması

Çalışmada kullanılan spermalar 3 koçun her birinden 8'er ejakulat olmak üzere haftada iki kez suni vajen yöntemiyle alındı. Toplanan sperma örneklerinde ejakulat miktarı (ml), spermatozoa motilitesi, spermatozoa yoğunluğu, ölü ve anormal spermatozoon oranları ve anormal akrozom oranları belirlendi. Motilite oranı %70 ve üzerinde, anormal spermatozoon oranları ise %20'nin altında olan ejakülatlar sulandırma işlemi için kullanıldı. Toplanan ejakülatlarda spermatozoon yoğunlukları hemositometrik yöntemle belirlendi ve üç farklı koçtan elde edilen spermalar deney tüpünde birleştirildi. Daha sonra üç eşit kısma ayrılarak sulandırılmaları yapıldı.

Bu çalışmada spermaların sulandırılmasında Tris sulandırıcı (3.63 gr tris, 0.50 gr fruktoz, 1.99 gr sitrik asit, 100.000 IU Penicillin G Sodium, 100 mg streptomycin sülfat, 14 ml yumurta sarısı/100 ml distile su - pH: 6.8) kullanıldı. Alınan spermalar 3 eşit hacme bölünerek BHT (0.6 mM) veya trehaloz (50 mM) içeren ve antioksidan içermeyen Tris sulandırıcıyla ml'de yaklaşık 200×10<sup>6</sup> spermatozoa olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırmayı takiben 32°C 5 dakika inkübe edilen sperma örnekleri 0.25 ml lik payetlere çekildi ve +5°C'ta muhafaza edildi. Daha sonra farklı antioksidan içeren veya kontrol grubuna ait örnekler, 0., 24., 48. ve 72 saatlerde spermatozoon parametreleri yönünden muayene edildi.

### Spermatozoon muayeneleri

Sperma motilitesi 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta 40 veya 20 lik objektifte değerlendirildi. Sperma tekrar uygun oranda sulandırılarak lam lamel arasına yerleştirildikten sonra motilite oranı belirlendi.

Ölü-canlı spermatozoon oranı supravital boyama tekniğiyle belirlendi. Eosin-nigrosin boyası kullanılarak hazırlanan frotilerde mikroskop yardımıyla en az 200 hücre sayılarak tam boya alanlar ölü, yarı boya alanlar ve hiç boya almayanlar canlı olarak kabul edildi.

Anormal spermatozoon oranı sıvı fikzasyon yöntemiyle belirlendi. Hancock solüsyonu (Hancock, 1952) kullanılarak fikze edilen hücreler lam-lamel arasında bir faz-kontrast mikroskop altında incelenerek çeşitli spermatozoon kısımlarına (akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk) ait bozukluklar ve bunların görülme oranları tespit edildi.

Spermatozoon membran bütünlüğünün belirlenmesi amacıyla HOS testi uygulandı (Jeyendran ve ark., 1984). Sperma örneklerinin 100 mOsm/lt ye ayarlanmış fruktoz solüsyonu içerisinde inkübe edilmesinden sonra preparatlar boyandı (Aisen ve ark., 2005). Boyanan preparatlardan toplam 200 hücre sayıldı, kıvrık kuyruklu spermatozoonlar pozitif olarak kabul edildi ve membran bütünlüğüne sahip spermatozoonların oranları belirlendi.

Akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranının belirlenmesi için spermatozoonlar önce sulandırıcının uzaklaştırılması amacıyla yıkandı ve prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoa oranları 0 ve 72. saatlerde belirlendi. Bu amaçla Larson ve Miller (1999) tarafından tanımlanan Coomassie blue boyama yöntemi uygulandı. Boyama sonrası hazırlanan preparatlardan toplam 200 hücre sayılarak, akrozom reaksiyonuna giren hücre oranı belirlendi.

**Tablo 1.** Farklı antioksidanlar içeren sulandırıcıyla koç spermının kısa süreli saklanmasında elde edilen spermatolojik parametreler.**Table 1.** Spermatological parameters obtained from short-term storage of ram semen with extenders containing different antioxidants.

| Spermatolojik parametreler                       | BHT              | Trehaloz        | Kontrol Grubu   | Ö.D (P) |
|--|------------------|-----------------|-----------------|---------|
| Motilite (%)                                     | 71.75±2.79       | 72.50±3.81      | 71.50±2.80      | -       |
| 0. saat<br>X±SX                                  |                  |                 |                 |         |
| Anormal spermatozoa oranı (%)                    | 11.83±2.89<br>ab | 6.81±2.37<br>a  | 17.98±2.27<br>b | *       |
| Canlı spermatozoa oranı (%)                      | 86.30±1.93       | 85.84±1.62      | 86.39±1.82      | -       |
| Membran bütünlüğü sağlam Spz. oranı (%)          | 45.58±4.36       | 42.72±5.57      | 47.17±4.52      | -       |
| Akrozom reaksiyonuna giren spermatozoa oranı (%) | 10.42±1.12       | 10.58±1.86      | 12.58±1.61      | -       |
| Motilite (%)                                     | 65.00±2.80       | 65.00±3.40      | 63.30±3.20      | -       |
| 24. saat<br>X±SX                                 |                  |                 |                 |         |
| Anormal spermatozoa oranı (%)                    | 17.17±3.44<br>ab | 11.00±2.29<br>a | 21.10±2.67<br>b | *       |
| Canlı spermatozoa oranı (%)                      | 83.84±1.40       | 82.30±1.82      | 83.16±1.78      | -       |
| Membran bütünlüğü sağlam spermatozoa oranı (%)   | 42.50±3.34       | 40.58±5.83      | 42.00±5.20      | -       |
| Akrozom reaksiyonuna giren spermatozoa oranı (%) | 16.50±2.32       | 13.75±1.53      | 19.58±2.52      | -       |
| Motilite (%)                                     | 60.75±2.39       | 56.75±4.94      | 60.00±2.03      | -       |
| 48. saat<br>X±SX                                 |                  |                 |                 |         |
| Anormal spermatozoa oranı (%)                    | 21.82±3.41       | 16.17±1.68      | 24.00±3.27      | -       |
| Canlı spermatozoa oranı (%)                      | 78.16±1.50       | 76.11±1.30      | 77.78±1.60      | -       |
| Membran bütünlüğü sağlam spermatozoa oranı (%)   | 43.40±5.41       | 39.72±6.86      | 44.75±5.51      | -       |
| Akrozom reaksiyonuna giren spermatozoa oranı (%) | 16.92±1.59       | 19.00±4.04      | 19.92±2.98      | -       |
| Motilite (%)                                     | 55.75±2.58       | 50.50±4.85      | 55.00±2.58      | -       |
| 72. saat<br>X±SX                                 |                  |                 |                 |         |
| Anormal spermatozoa oranı (%)                    | 29.50±3.24       | 23.82±2.29      | 31.10±2.84      | -       |
| Canlı spermatozoa oranı (%)                      | 74.84±1.25       | 73.30±1.71      | 74.68±1.68      | -       |
| Membran bütünlüğü sağlam spermatozoa oranı (%)   | 37.00±4.69       | 33.69±3.57      | 38.92±4.71      | -       |
| Akrozom reaksiyonuna giren spermatozoa oranı (%) | 20.84±2.10       | 20.25±2.96      | 20.10±3.11      | -       |

ÖD: Önemlilik değeri

\* : (P&lt;0.05)

a,b: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli

- : Grup ortalamaları farkı önemli değil (P &gt;0.05)

**Spermalarda kısa süreli saklama sonrası fertilité düzeylerinin belirlenmesi**

Koyunlara mayıs ayı ortasında 12 gün süre ile intravaginal sünger (60 mg Medroksiprogesteron asetat, Esponjavet, Hipra) uygulandı ve süngerlerin çıkarılmasını takiben de 300 IU eCG (Folligonan, Intervet) kombinasyonu ile senkronize edildi. Süngerlerin çıkartılmasından yaklaşık 48 saat sonra östrus arama koçları yardımıyla belirlendi. Östrusta olduğu belirlenen koyunlar 5°C 24 saat muhafaza edilen sperma örnekleriyle

laparoskopik yolla intrauterin olarak, her hayvan 200x10<sup>6</sup> spermatozoon düşecek şekilde tohumlandı. Koyunlarda tohumlama sonrası 35. günde real-time ultrasonografi yardımıyla gebelik tanısı yapıldı.

**İstatistiksel Analizler**

Araştırmada, her antioksidan ve kontrol grubuna ait spermatolojik parametrelerin (spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa, canlı anormal akrozom ve ölü spermatozoa

**Tablo 2.** Farklı antioksidanlar içeren sulandırıcıyla koç spermasının kısa süreli saklama sonrası elde edilen gebelik oranları.  
**Table 2.** Pregnancy rates obtained from short-term storage of ram semen with extenders containing different antioxidants.

|                          | BHT           | Trehaloz      | Kontrol       | ÖD |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|----|
| Gebelik Oranı (%)<br>(n) | 50%<br>(5/10) | 20%<br>(2/10) | 40%<br>(4/10) | -  |

ÖD: Önemlilik değeri

- : Grup ortalamaları farkı önemli değil (P >0.05)

oranlarının) karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi uygulandı. Farklılık çıkan grupların karşılaştırılmasında Duncan testi kullanıldı. Bu sperma örnekleriyle yapılan tohumlamalar sonucunda elde edilen gebelik oranlarının karşılaştırılmasında da ki-kare yönteminden yararlanıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı P<0.05 olarak kabul edildi. Tablonun hazırlanmasında ortalama değerler ortalama standart sapması ile birlikte sunuldu.

## Bulgular

Koç spermasının kısa süreli saklanmasında (72 saat süresince) BHT ve trehalozun spermatozoa motilitesi üzerine etkili olmadığı gözlenmiştir. Tablo 1’de görüldüğü üzere, anormal spermatozoa oranları antioksidan içeren iki grupta kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Bununla birlikte trehaloz içeren grubun değerlerinin kontrol grubuna göre oldukça düşük olduğu tespit edilmiş, özellikle ilk 24 saat içerisinde elde edilen farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlendi (P<0,05).

Canlı spermatozoa oranı, membran bütünlüğü sağlam spermatozoa ve akrozom reaksiyonuna giren spermatozoa oranları bakımından 0 ile 72. saatler arasında antioksidanların istatistiksel olarak önemli farklılıklar oluşturmadığı saptandı (P >0,05) (Tablo 1).

Bu çalışmada 5°C 24 saat muhafaza edilen sperma örnekleriyle laparoskopik yöntemle intrauterin olarak yapılan tohumlamalardan elde edilen gebelik oranları BHT grubunda %50 trehaloz grubunda %20 kontrol grubunda ise %40 bulundu. BHT’nin trehaloz ve kontrol grubuna göre gebelik oranları üzerine sayısal olarak olumlu bir katkı sağladığı gözlenmekle birlikte gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel ölçüye ulaşmamıştır (Tablo 2).

## Tartışma ve Sonuç

Spermatozoon plazma membranı doymamış yağ asitince zengin olduğundan lipit peroksidasyonuna karşı son derece duyarlıdır. Spermanın kısa süreli saklanması sırasında hücreler lipit peroksidasyona maruz kalabilmekte ve bunun sonucu olarak da spermatozoon motilitesinde ve membran bütünlüğünde kayıplar ve fertilitate oranlarında düşmeler yaşanmaktadır (Salamon ve Maxwell, 2000). Bu olumsuz etkiler, spermanın saklanması öncesi sulandırıcılara bazı antioksidanların ilavesiyle dengelenmeye çalışılmaktadır (Maxwell ve Stojanov, 1996; Yıldız ve Daşkın, 2004; Lopez-Saaz ve ark., 2000; Bucak ve Tekin, 2007).

Sperma sulandırıcılarına eklenen trehaloz spermatozoonlar için ozmotik basıncı ayarlar ve kriyoprotektan olarak etki gösterir. Non-permeable bir disakarit olan trehaloz su kaybı sırasında hücre membranında oluşan olumsuz etkilerin önlenmesinde önemli bir etkiye sahip olduğu (Molinia ve ark., 1994) ve bununla spermadaki endojen glutatyon (GSH) tüketimini azalttığı ve ortamda oluşan serbest radikalleri temizleyerek olumlu bir etki sağladığı yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir (Aisen ve ark., 2005). Yine buna benzer ifadeler son yıllarda yapılan çalışmalarda da sperma sulandırıcılarına eklenen

trehalozun spermanın kısa süreli saklanılan koç spermasının spermatolojik parametreleri üzerine önemli derecede olumlu etkileri olduğu bildirilmektedir (Lopez-Saaz ve ark., 2000; Bucak ve Tekin, 2007; Bucak ve ark., 2007). Lopez-Saaz ve ark. (2000) koç spermasının kısa süreli saklanmasında sperma sulandırıcısına antioksidan olarak trehaloz ilave etmişlerdir. Trehalozun diğer gruplara göre motil spermatozoa oranları üzerine önemli derecede pozitif katkı sağladığını bildirmişlerdir. Bunu destekler nitelikte Bucak ve Tekin de (2007) koç spermasının kısa süreli saklanılmasında trehalozun spermatozoa motilitesi üzerine 30. saatte kontrol grubuna en iyi korumayı sağladığını ifade etmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada, trehaloz ile sulandırılmış grupta tüm zaman aralıklarında kontrol grubuna kıyasla önemli oranda spermatozoa membran bütünlüğünün korunduğunu, anormal spermatozoa oranının düşük kalması üzerine 0. saatte önemli bir etkinin olmasına rağmen, saklamanın 24. ve 30. saatlerinde ise istatistiksel bir farklılık olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ise Lopez-Saaz ve ark. (2000) ve Bucak ve Tekin’in (2007) bildirdiklerinin aksine tüm değerlendirme aşamalarında sperma sulandırıcısı katılan trehalozun kontrol grubuna göre motilite, canlı spermatozoa oranı, membran bütünlüğü sağlam spermatozoa ve akrozom reaksiyonuna giren spermatozoa oranları üzerine istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir. Buna birlikte Bucak ve Tekin’in (2007) bildirdiklerini destekler şekilde, bu çalışmada trehalozun ilk 24 saat içerisinde kontrol grubuna göre anormal spermatozoon oranlarının düşük düzeyde kalması üzerine önemli derecede olumlu katkı sağladığı ortaya konulmuştur.

Genel olarak, işlenmiş spermada şekillenen membran hasarları soğutma esnasında sıcaklığın özellikle 20°C den 5°C ‘e hızlı düşmesi sonucu soğuk şoku yaralanmalar ve/veya depolama sırasında spermatozoonların yaşlanmasına bağlı olarak meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Watson, 2000; Paulenz ve ark., 2002). Spermanın soğutulması sırasında ısının düşmesine bağlı olarak faz geçişi esnasında spermatozoonların plazma membranlarında yer alan lipidler fiziksel bir değişikliğe uğrayarak yumuşak ve akışkan durumlarını yitirir, daha sert ve daha az akışkan bir hale gelirler (White, 1993). Soğutma sırasında spermatozoon membranlarında ortaya çıkan hasarların bu faz geçişi sonrasında lipidlerin yeniden başlangıçtaki biçimde organize olamaması veya normal dağılımlarını kazanamamaları neticesi olduğu ifade edilmektedir (Holt ve North, 1986; Buhr ve ark., 1994). Koç spermatozoonları membranlarının yüksek oranda doymamış fosfolipit içermeleri nedeniyle soğuk şokuna daha duyarlı olarak kabul edilirler (Salamon ve Maxwell, 2000).

Butylated hidroksitoluen (BHT), lipofilik fenolik bir antioksidandır ve çeşitli hayvan türlerinin spermatozoonlarının soğuk kaynaklı membran stresi üzerinde hafifletici etkisi olduğu tespit edilmiştir (Watson ve Anderson, 1983). Hücreler soğuk şokuna girdiğinde, BHT spermatozoa plazma membranındaki geçirgenlik değişimlerini büyük ölçüde azaltmaktadır (Parks ve Graham, 1992). Khalifa ve ark., (2008) yumurta sarısı yokluğunda sulandırıcıya ilave edilen BHT’nin 5° C de soğuk şoku yaralanmalarına karşı keçi spermatozoa membranları üzerinde koruyucu etkisi olduğunu ve canlı spermatozoa ve

motilite oranlarını istatistiksel olarak artırdığını bildirmiştir. Domuz sperması üzerinde yapılan başka bir çalışmaya göre BHT ilave edilerek sulandırılmış ve dondurulmuş sperma çözüldüğünde spermatozoa motilitesi üzerinde kontrol grubuna göre önemli oranda iyileşmeler sağladığı belirtilmiştir (Roca ve ark., 2004). Bunun yanı sıra BHT'nin boğalarda çözüm sonu spermatozoa parametreleri üzerine olumlu bir etkisinin olmadığı bildirilmektedir (Çoyan ve ark., 2011). Sunulan çalışmada soğuk şoku ve etkilerine karşı sulandırıcıya ilave edilen BHT grubunda 5°C'de depolama sırasında kontrol grubuna göre daha az membran hasarı olduğu, ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Yine buna ek olarak spermatozoa motilitesi, canlı, anormal spermatozoa ve akrozom reaksiyonuna giren spermatozoa oranları üzerine de BHT'nin istatistiksel olarak olumlu etkileri olmadığı gözlemlendi. Yapılan çalışmalardaki farklı sonuçların ortaya çıkması, kullanılan sperma sulandırıcılar ile sulandırıcıların içerdiği farklı komponentlerin miktar ve oranlarının, özellikle sperma sulandırıcılarına eklenen antioksidanların farklı konsantrasyonlarda olmasına, türe özgü spermatozoon membran yapılarının farklı özellik göstermesine mevsime ve bireysel farklılıklara bağlanabilir.

Bu çalışmada 5°C 24 saat muhafaza edilen sperma örnekleriyle laparoskopik yöntemle intrauterin olarak yapılan tohumlamalardan elde edilen gebelik oranları BHT grubunda (%50) trehaloz grubunda %20 kontrol grubunda ise %40'dır. Benzer bir gözlem de Khalifa ve ark., (2008) tarafından bildirilmiştir. Khalifa ve ark., (2008) keçi spermasına ilave edilen yumurta sarılı BHT, yumurta sarısız BHT ve sadece yumurta sarısı ile dondurdukları spermalarından sırasıyla %62.5, %53.7 ve %38.7 oranlarında gebelik elde etmişlerdir. Trehaloz grubunda gebelik oranının sayısal olarak düşük olması, sulandırıcıya ilave edilen trehalozun ortamı hipertonic hale getirmesi ile ilişkili olabilir. Ayrıca değişik sperma sulandırıcılarına katılan antioksidanların miktar, oran ve türünün farklı olması, sulandırma, soğutma teknikleri ve senkronizasyon yöntemleri de beklenen etkiyi değiştirebilmektedir.

Sonuç olarak, hayvan türlerinde kısa ve uzun süreli saklanılan spermanın fertilité yeteneğini artırmak için, sulandırıcılara bazı antioksidan maddeler katılmaktadır. Genel olarak olumlu etkileri olmakla birlikte, antioksidanların etkinlikleri hayvan türüne, sulandırıcı bileşenlerine ve dondurma protokollerine göre değişmektedir. Bu çalışmada sperma sulandırıcısına katılan trehalozun anormal spermatozoa oranının düşük kalması üzerine pozitif bir etki yaptığı, BHT'nin ise gebelik oranları üzerine sayısal olarak olumlu bir katkı sağladığı gözlemlendi

## Teşekkür

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi (Proje kodu:VTF 12001) tarafından desteklenmiştir

## Kaynaklar

- Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM (2005). Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal Andrology* 26, 654-660.
- Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H and Venturino A (2005). Ultrastructural and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 50, 239-249.
- Aitken RJ, Baker MA (2004). Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction Fertility Development* 16, 581-588.
- Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H, Aurich C (1997). Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* 48, 185-192.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and

- membrane lipid peroxidation. *Journal Andrology* 21, 895-902.
- Bucak MN, Tekin N (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research* 73, 103-108.
- Bucak MN, Tekin N, Kulaksız R (2007). Koç spermasının kısa süreli saklanmasında antioksidanların etkisi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi* 47,15-21.
- Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS (1994). Composition and behavior of head membrane-lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31, 224-238.
- Chen HJ, Wu SB, Chang CM (2003). Biological and dietary antioxidants protect against DNA nitration induced by reaction of hypochlorous acid with nitrite. *Archives of Biochemistry Biophysics* 415, 109-116.
- Çoyan K, Güngör Ş, Başpınar N, Ömür AD, Öztürk C, Bucak MN, Ataman MB (2011). Boğa sperma sulandırıcısına katılan BHT ve Sistin'in sperma parametreleri üzerine etkisi. 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, Antalya, Türkiye, s. 44.
- Hancock JL (1952). The morphology of bull spermatozoa. *Journal of Experimental Biology* 9, 445-453.
- Holt WV, North RD (1986). Thermotropic phase-transitions in the plasma-membrane of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 78, 447-457.
- Ijaz A, Ducharme R (1995). Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. *Theriogenology* 44, 1039-1050.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG and Zaneveld LJD (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70, 219-228.
- Jones R, Mann T, Sherins RJ (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acids peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility* 31, 531-537.
- Khalifa TAA, Lymberopoulos AG, El-Saidy BE (2008). Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 525-530.
- Larson JL, Miller DJ (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular Reproduction Development* 52, 445-449.
- Lopez-Saaz A, Ortiz N, Gallego L, Garde JJ (2000). Liquid Storage (5°C) of Ram Semen in Different Diluents. *Archives of Andrology* 44, 155-164.
- Maxwell WMC, Stojanov T (1996). Liquid storage of ram semen in the absence of some antioxidants. *Reproduction Fertility Development* 8, 1013-1020.
- Molinia FC, Evans G, Casares PI, Maxwell WMC (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in tris based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 36, 113-122.
- Parks JE, Graham JK (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209-222.
- Paulenz H, Söderquist L, Perez-Pe R, Berg KA (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57, 823-836.
- Roca J, Gil MA, Hernandez M, Vazquez JM, Martinez EA (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology* 25(3), 397-405.
- Salamon S, Maxwell WMC (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science Anim Reprod Sci* 62, 77-111.
- Watson PF, Anderson WJ (1983). Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *Journal of Reproduction and Fertility* 69, 229-235.
- Watson PF (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60: 481-492.
- White IG (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction Fertility Development* 5, 639-658.
- Yıldız S, Daşkın A (2004). Koç spermasının farklı antioksidanlar içeren sulandırıcılarla kısa süreli saklanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 10, 155-159.