

The Effect Of A-Tocopherol On Ram Semen Freezability In Non-Breeding Season

Ayhan ATA¹, Muhammed Enes INANC^{1*}, Sukru GUNGOR¹

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Burdur/Turkey

*Sorumlu Yazar

E-mail:enesinanc@hotmail.com

Özet

Bu çalışmanın amacı, sezon dışı dönemde değişik oranlardaki α -tokoferolün koç spermasının dondurulabilirliğine etkisini incelemektir. Çalışmada 4 adet Merinos koçu (2-3 yaşlarında ve Bademli/Burdur'da özel bir işletmede) kullanıldı. Elektroejakülatör kullanılarak koçlardan alınan ejakulatlardan > %80 motilite ve 1.5×10^9 spermatozoa/ml üzerinde yoğunluğu bulunan ejakulatlar birleştirildi. Birleştirilen ejakulat beş eşit gruba ayrılarak 0 mg (kontrol), 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M or 800 μ M α -tokoferol içeren tris ile sulandırıldı, 4 C° de ekibrilasyon yapılarak mini payetlerde donduruldu ve sıvı azotta depo edildi. Payetler daha sonra spermatozojik analizler için 37 C° de 30 sn çözdürüldü.

Kontrol grubuna (37.50 \pm 7.90; 26.85 \pm 3.17) göre sırası ile en yüksek motilite ve membran bütünlüğü 100 μ M grupta (47.77 \pm 4.40; 34.83 \pm 2.64) tespit edildi (p<0.05). Ayrıca gruplar arası anormal sperma muayene sonuçlarında istatistiksel bir farklılık bulunmadı (p>0.05).

Sonuç olarak, 100 μ M α -tokoferol koç sperma dondurma sulandırıcılarına kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sezon dışında motilite ve membran bütünlüğünü iyileştirdiği için eklenmelidir.

Anahtar kelimeler: α -tokoferol, koç sperması dondurulabilirliği, sezon dışı, motilite, membran bütünlüğü, anormal spermatozoa oranı.

The Effect Of A-Tocopherol On Ram Semen Freezability In Non-Breeding Season

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of different rate of α -tocopherol on ram semen freezability in non-breeding season. In this study, four Merino rams (2-3 ages were used and belonging to the special sheep farm in Bademli, Burdur/Turkey. Ejaculates were collected from the rams using an electro ejaculator, the ejaculates containing spermatozoa with >80% motility and concentrations higher than 1.5×10^9 spermatozoa/ml were mixed and used in the study. The mixed ejaculates were divided into five equal aliquots and samples were extended with tris containing 0 mM (control), 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M or 800 μ M α -tocopherol and they were equilibrated to 4°C and frozen in mini straws then stored in liquid nitrogen. Straws were thawed at 37°C for 30 s in water bath for spermatozoological examination

The 100 μ M group had the highest motility (47.77 \pm 4.40) and membrane integrity than control (37.50 \pm 7.90; 26.85 \pm 3.17) respectively (p<0.05). Also, there were no significant differences between the groups on total abnormal spermatozoa rate (p>0.05).

In conclusion, α -tocopherol 100 μ M should addition to ram semen freezing medium on non-breeding season for improvement of motility and membrane integrity compared to control.

Keywords: α -tocopherol, ram semen freezability, non-breeding season, motility, membrane integrity, abnormal spermatozoa rate.

GİRİŞ

Türkiye'de koyun yetiştiriciliği, tarımsal amaçla kullanılmayan mera ve otlaklardaki bitki örtüsünü et, süt, yapağı gibi ürünlere dönüştüren önemli bir etkinliktir. Bu yolla ekonomiye ve insan beslenmesine katkıda bulunan bir endüstri koludur. İnsan beslenmesinin temelini oluşturan ve ülkemizin tarımsal anlamda en önemli geçim kaynaklarından olan koyun yetiştiriciliğinde üretimin hızlandırılması, ortam etkilerinin geliştirilmesinin yanı sıra, gen kaynaklarının ıslahı da gereklidir. İslahın temelini hayvanların döl verimleri ile ilgili yapılan çalışmalar oluşturmaktadır. Döl verimleri ile ilgili çalışmalarda öne çıkan en önemli araç ise spermatozojik araştırmalar ve bunların önderliğinde yapılacak olan suni tohumlama çalışmalarıdır. Suni tohumlamanın faydalarından yararlanılmak istendiğinde uzun süre saklanabilen sperma gereklidir. Spermatozoa'nın metabolik faaliyetleri bazal düzeye indirilerek fertilizasyonda önemli bir kayba yol açmadan süresiz bir şekilde saklanması ancak spermanın dondurulması ile mümkündür (1). Spermanın saklanması sırasında yapılacak uygulamalar sonucunda oluşacak reaktif oksijen türevleri (ROT) antioksidan savunma sistemini bozarak oksidatif strese yol açar (2). Bunun sonucunda ise

fertilite kayıpları oluşmaktadır (3). Oksidatif stres, anti-oksidan savunma sisteminde azalma ve/veya serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimi sonucu oluşarak protein, lipid ve DNA'nın yapısını bozarak motilite ve mitokondrial aktivitede azalma ve paternal genomlarda hasar oluşturmaktadır (4). Anti-oksidanlar ise, serbest radikallerin etkilediği oksidatif strese karşı spermatozoanın savunmasında görev alır. Anti-oksidan mekanizması, pek çok hücrenin sekresyonunda ve dokusunda bulunmaktadır. Bunlardan bir kısmı ROT üretimini önleyerek, bir kısmı da mevcut ROT'u yok ederek görevini gerçekleştirmektedir. Antioksidan olarak görev alan vitamin E (α -tokoferol), ratlarda (5), domuzlarda (6), koçlarda (7) ve beşeri hekimlikte (8) oksidatif stresi azaltarak spermatozojik parametreleri iyileştirdiği belirlenmiştir.

Buradan hareket ederek, bu çalışmanın amacı, değişik oranlardaki α -tokoferolün sezon dışında koç spermasının dondurulabilirliğine etkisini incelemektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Hayvan Materyali

Araştırmada, 2- 3 yaşlarında ve Bademli/Burdur'da özel bir işletmede bulunan 4 adet Merinos koçu kullanıldı.

Çalışma Planı

Elektroejakülatör kullanılarak koçlardan sperma alındı. Alınan ejakulatlardan > %80 motilite ve 1.5×10^9 spermatozoa/ml üzerinde yoğunluğu bulunan ejakulatlar birleştirildi.

Tris bazlı sulandırıcı (3.63 g Tris, 1.82 g sitrik asit, 0.5 gr glikoz, %20 yumurta sarısı, %6 gliserol, 100 ml distile su, pH 6.8) temel sulandırıcı olarak kullanıldı. α -tokoferol (800 μ M) 1 ml etanolde çözündürüldü ve böylece stok solüsyon oluşturuldu.

Birleştirilen ejakulat beş eşit gruba ayrılarak 0 mM (Kontrol), 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M or 800 μ M α -tokoferol içeren tris ile ml'de 500×10^6 spermatozoa/ml olacak şekilde sulandırıldı, 4 C°'de ekilibrasyon yapılarak mini payetlerde donduruldu ve sıvı azotta depo edildi.

Spermatolojik Muayeneleler

Motilite subjektif yöntemle, 37°C ayarlanan ısıtma tablasına sahip faz-kontrast mikroskop kullanılarak 5 farklı mikroskop sahasının ortalamaları motilite değeri (%) belirlendi. Anormal spermatozoa oranı Hancock solüsyonu (62.5 ml formalin (37%), 150 ml salin solüsyonu, 150ml buffer solüsyonu ve 500ml bidistile su) ile faz-kontrast mikroskopunda $\times 1000$ lik büyütmede toplam 200 adet spermatozoa incelenerek (%) belirlendi. Numunelerdeki spermatozoon membran fonksiyonel bütünlüğün belirlenmesi amacıyla Hipo osmotik Swelling (HOS) test uygulandı. Su banyosunda 37 °C'deki 100mOsm'lük HOS test sıvısından 100 μ l alınarak üzerine sperma numunesinden 10 μ l eklendi. Bu karışımın 37 °C'ta 60 dakika inkübasyonu sonrası, lam üzerine bir damla alınıp lamel kapatıldı ve ısıtma tablası üzerine fikse edildi. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında ($\times 400$) incelenerek 200 hücre sayılıp ve kuyruktaki kıvrımlar dikkate alınarak HOS teste yanıt veren spermatozoonlar (%) belirlendi. Kuyruğu kıvrık olan spermatozoonlar membran bütünlüğü sağlam olarak değerlendirildi (9).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesinde normal dağılım değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Tukey testi'nden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. SPSS 22.0 paket programından yararlanıldı. $P < 0.05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi.

Çalışmada elde edilen morfolojik bütünlük (anormal spermatozoa oranı, %), motilite (%) ve membran bütünlüğü (HOS test, %) sırasıyla Tablo 1, 2'de verildi.

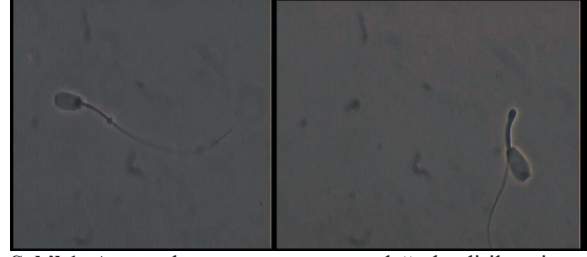
Tablo 1: Çözüm sonu anormal spermatozoa oranları

Gruplar	Anormal Spermatozoa Oranı (%)			
	Baş	Orta	Kuyruk	Toplam
Kontrol	0.50 \pm 0.1 ^b	1.51 \pm 0.72	14.96 \pm 4.28 ^{ab}	16.98 \pm 4.95
100 μ M	2.29 \pm 0.3 ^a	2.23 \pm 0.99	9.52 \pm 1.63 ^a	14.05 \pm 3.21
200 μ M	1.07 \pm 0.31 ^b	2.30 \pm 1.70	12.92 \pm 3.51 ^{ab}	16.30 \pm 4.08
400 μ M	1.29 \pm 0.30 ^b	1.55 \pm 0.50	13.39 \pm 5.47 ^{ab}	16.23 \pm 5.73
800 μ M	2.24 \pm 0.35 ^a	1.16 \pm 0.22	13.15 \pm 5.14 ^{ab}	16.56 \pm 5.47
P	***		***	

***Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan farklıdır ($P < 0.05$).

Tablo 2: Çözüm sonu motilite ve Membran bütünlüğü (HOS test) oranları

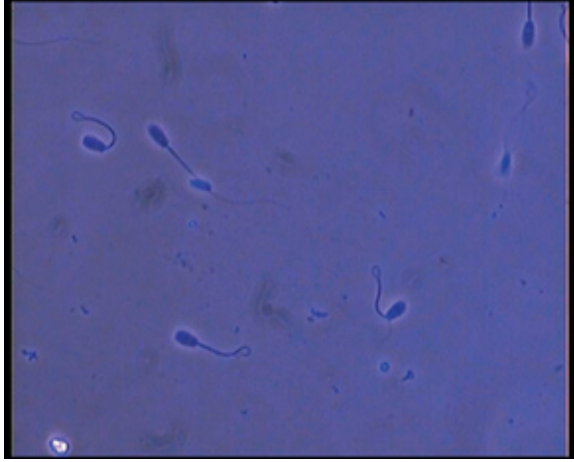
Gruplar	Motilite (%)	Hos Test (%)
Kontrol	37.50 \pm 7.90 ^b	26.85 \pm 3.17 ^b
100 μ M	47.77 \pm 4.40 ^a	34.83 \pm 2.64 ^a
200 μ M	14.50 \pm 4.37 ^c	26.14 \pm 2.20 ^b
400 μ M	1.50 \pm 0.73 ^d	14.49 \pm 4.18 ^c
800 μ M	-	10.63 \pm 2.35 ^d
P	***	***



Şekil 1: Anormal spermatozoa oranının değerlendirilmesi

Farklı konsantrasyonlarda α -tokoferol içeren koç spermasının çözüm sonu spermatolojik parametreleri incelendiğinde, kontrol grubuna (37.50 \pm 7.90; 26.85 \pm 3.17) göre sırası ile en yüksek motilite ve membran bütünlüğü 100 μ M grupta (47.77 \pm 4.40; 34.83 \pm 2.64) tespit edildi ($p < 0.05$). Anormal spermatozoa oranı incelendiğinde total morfolojik bütünlük açısından gruplar arasında bir farklılık bulunmadı ($p > 0.05$). Domuz spermasının dondurulmasında farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400, 600 ve 800 μ m) α -tokoferol içeren sulandırıcı kullanarak çözüm sonunda motilite ve VCL, VSL, VAP gibi kinetik parametreler yanında canlı spermatozoa, akrozom bütünlüğü, apoptozis oranı gibi spermatolojik parametreler incelenmiştir (10). Çalışmanın sonucunda 100 ve 200 μ m konsantrasyonda ilave edilen α -tokoferolün, çözüm sonu spermatozoa canlılığı ve total motilite üzerinde olumlu etkisi olduğunu tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan en düşük dozun diğer dozlarla göre canlılık ve motilite açısından daha iyi sonuç vermesi yönünden bizim çalışmamızla benzerlik gösterdiği görülmektedir. Çünkü çalışmamızda en yüksek motilite ve membran bütünlüğü 100 μ M grubunda tespit edilmiştir. Daramola ve ark. (11) çalışmalarında Batı Afrika tekelerin yemlerine vitamin E takviyesi yaparak sperma ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkisini incelediği çalışmada 0 mg, 15 mg, 30 mg ve 45 mg vitamin E'den oluşan 4 grup oluşturularak bir ay süresince spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri yönünden incelendiği çalışmada E vitaminin spermatolojik parametreleri iyileştirdiği ve oksidatif stres parametrelerini engellediği tespit edildi. Yapılan diğer çalışmalarda, Vitamin E (α -Tocopherol), C vitamini, ko-enzim (Q10), glutatyon gibi birçok anti-oksidanların erkek infertilitesinin tedavisine olumlu cevaplar verdiği bilinmektedir. (12). Yapılan bu çalışmada da kontrol grubuna göre 100 μ M grubun en iyi sonucu vermesi bu çalışmanın sonuçları ile benzer olduğunu göstermektedir. Vitamin C'nin glutatyon ve vitamin E ile kombine tedavisi sonrasında, spermatozoa hidroksi-guanin seviyesi düşüp, spermatozoa konsantrasyonunda artışlar sağladığı tespit edilmiştir (13). Vitamin C'nin Vitamin E ile birlikte kullanıldığında ise, DNA kırılmalarını azalttığı bildirilmiştir (14). Burdan hareket ederek, soğuk soğukuna ve dondurma hasarına karşı α -tokoferolün uygun dozlarının spermatozoa membranlarını, fosfolipit/kolesterol oranını ve antioksidan

seviyesini koruduğu söylenebilir. Ayrıca beşeri hekimlikte sperm motilite düşüklüğü şikâyeti olan erkeklerde, vitamin E (α -tokoferol) tedavisi sonrası lipid peroksidasyonun azaldığı, motilite ve gebelik oranlarının arttığı bildirilmektedir (8).



Şekil 2: HOS Testin Değerlendirilmesi

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, 100 μ M α -tokoferol koç sperma dondurma sulandırıcılarına kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sezon dışında motilite ve membran bütünlüğünü iyileştirdiği için eklenmelidir. Ayrıca, yapılan bu çalışmanın sezon içinde de tekrarlanması önerilmektedir. Çünkü kullanılan diğer dozların çalışmanın yapıldığı sezondan etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi sayesinde, bu çalışmaya farklı bir yönden bakmamızı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Lemma A. 2011. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, Artificial Insemination in Farm Animals. Dr. Milad Manafi (Ed.), ISBN: 978-953-307-312-5.
- [2] Satorre MM., Breining E., Beconi M.T., Beorlegui NB. 2007. α -tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm, *Theriogenology*, 68: 958–965.
- [3] Parks JE., Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209–22.
- [4] Bennetts LE, Aitken RJ. 2005. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 71:77–87.
- [5] Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI. 2003. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim Reprod Sci.*, 76: 99-111.
- [6] Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci.*,78: 85–98. PMID: 12753785.
- [7] Maia MS, Bicudo SD, Azevedo HC, Sicherle CC, Sousel DB, Rodello L. 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Res.*, 85: 85–90.
- [8] Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, El-Malik EM, Nasr MA. 1996. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl.*,17: 530-537.
- [9] Kulaksız R. 2009. Farklı Antioksidanlar eklenmiş sulandırıcılarla dondurulmuş Saanen teke spermasının in vitro değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi.

[10] Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Kumar BM, Balasubramanian, Rho GJ. 2009. Effect of α -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*, 58: 181–189.

[11] Daramola J, Adekunle E, Oke O, Ogundele O, Saanu E, Odeyemi A. 2016. Effect of vitamin E on sperm and oxidative stress parameters of west African Dwarf Goat Bucks. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 19: 151-158.

[12] Sinclair S. 2000. Male infertility: Nutritional and environmental considerations. *Alternatives Med Rev*, 5: 28–38.

[13] Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. 1997. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*, 68: 519-24.

[14] Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl*, 26: 349-53.