

Metiyonin ve Trehaloz İçeren Sulandırıcıların Koç Spermalarının Dondurma-Çözdürme Sonrası Sperm Akrozom Bütünlüğü ve Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri

Pınar PEKER AKALIN¹, Nuri BAŞPINAR², Kenan ÇOYAN³, Mustafa Numan BUCAK⁴, Mehmet Bozkurt ATAMAN⁴, Ali Doğan ÖMÜR⁵, Ali BİLGİLİ⁶, Şükrü GÜNGÖR⁷, Serpil SARIOZKAN⁸, Caner ÖZTÜRK⁴, Mustafa BODU⁴, Begimay ACİBAEVA⁴

¹Mustafa Kemal Üni. Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kampüs, Hatay

²Selçuk Üni. Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kampüs, Konya

³Pamukkale Üni. Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Denizli

⁴Selçuk Üni. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kampüs, Konya

⁵Atatürk Üni. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum

⁶Ankara Üni. Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

⁷Mehmet Akif Ersoy Üni. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Burdur

⁸Erciyes Üni. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kayseri

pinarpekakalin@hotmail.com

Özet

Bu çalışmada, güvercin yumurta sarısıyla hazırlanmış koç spermaları sulandırıcılarına eklenen metiyonin ve trehalozun dondurma sonrası spermatolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Araştırmada 3 baş ergin (1-2 yaş) Konya Merinosu ırkı koçlara ait ejakülatlar kullanıldı. Miks yapılan ejakülatlar 3 eşit hacme bölünerek güvercin yumurtası (kontrol), güvercin yumurtası + 2 mM metiyonin ve güvercin yumurtası + 25 mM trehaloz içeren Tris sulandırıcısıyla ml'de yaklaşık 4×10^8 spermatozoa olacak şekilde 37 °C'ta sulandırıldı ve donduruldu. Dondurma-çözdürme sonrası metiyonin içeren sulandırıcı grubunda LPO düzeyleri ($103.6 \pm 12.6 \mu\text{mol}$) trehaloz içeren gruba ($66.2 \pm 9.5 \mu\text{mol}$) göre daha yüksek ($p < 0.05$) iken, kontrol grubu ($81.3 \pm 7.6 \mu\text{mol}$) ile fark önemsizdi ($p > 0.05$). GPx aktivitesi ve GSH düzeyleri yönünden incelendiğinde, farklı sulandırıcılarla sulandırılmış sperma grupları arasında önemli bir fark gözlenmedi.

Metiyonin içeren sulandırıcı grubunda akrozom bütünlüğü (50.0 ± 3.0) kontrol grubuna göre (36.7 ± 3.2) daha yüksek ($p < 0.05$) olarak belirlenirken, motilite ve membran bütünlüğü yönünden incelendiğinde gruplar arası bir farklılık belirlenmedi. Çalışmada sulandırıcıya eklenen metiyoninin çözüm sonu spermatozoa akrozom bütünlüğünü iyileştirdiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, dondurma-çözdürme, sperma, sperma sulandırıcısı

Effects of Extenders Containing Methionine and Trehalose on Ram Sperm Acrosome Integrity and Some Biochemical Parameters After Freeze-Thawing

Abstract

The aim in this study was to investigate the effects of methionine and trehalose in the pigeon egg yolk based extenders on spermatological and biochemical parameters after freeze-thawing of ram semen. Semen samples from 3 mature Konya Merino rams (1 and 2 years of age) were used in the study. Ejaculates were mixed and were split into 3 equal aliquots and diluted at 37 °C with the base extenders (pigeon based) containing L-methionine 2 mM and trehalose 25 mM, and no antioxidant (control), respectively - with a final concentration of approximately 4×10^8 spermatozoa/ml and then were frozen (in a single step). After freeze-thawing, in the extender containing methionine, LPO levels ($103.6 \pm 12.6 \mu\text{mol}$) were higher ($p < 0.05$) from that in the extender containing trehalose ($66.2 \pm 9.5 \mu\text{mol}$) but not from control ($81.3 \pm 7.6 \mu\text{mol}$, $p > 0.05$). As regards Gpx activity and GSH levels there were no significant differences between the groups.

Acrosomal integrity was higher (50.0 ± 3.0) in the extender containing methionine from that in control (36.7 ± 3.2 , $p < 0.05$) whereas there were no significant differences between the groups regarding

motility and membrane integrity. It is concluded that methiyonin added to the extender improved the sperm acrosome integrity after freeze-thawing.

Keywords: Antioxidant, freeze-thawing, semen, semen extenders

Giriş

Spermanın ilk kez Polge ve ark. (1949) tarafından başarılı bir şekilde dondurulma işleminden sonra, kriyoprezervasyonu geliştirmek amacıyla bir çok çalışma yapılmıştır. Ancak kriyoprezervasyon spermatozoada motilite, canlılık, fertilizasyon kapasitesi ve membran bütünlüğünün kaybına, spermatozoon apoptozisinin indüklenmesine neden olmakta (Aitken ve ark., 1998; Vishwanath ve ark., 2000; Medeiros ve ark., 2002) ve bu zararlı etkilerini soğuk şoku, buz kristallerinin oluşumu, oksidatif stres, ozmotik değişimler ve lipid-protein reorganizasyonlarına yol açarak gerçekleştirmektedir (Watson ve ark., 1995; Bailey ve ark., 2000). Spermatozoon membran lipidlerinin peroksidasyonu sırasında meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) düşük sperma kalitesinin en önemli nedenleri arasında sayılmaktadır (Alvarez ve Storey, 1983; Alvarez ve Storey, 2005). Koç spermatozoonu diğer türlere göre daha yüksek membran poliansatüre/satüre yağ asidi oranı ve daha düşük kolesterol/fosfolipid oranına sahip olduğu için ROS'un zararlı etkilerine daha duyarlıdır (Aitken ve Fisher 1994; Gandini ve ark., 2000).

Tavuk yumurta sarısı (*Gallus gallus*) hem kolaylıkla ulaşılabilmesi hem de sperm kriyoprezervasyonu sırasında plazma membranı ve akrozom bütünlüğünü koruması nedenleri ile yaygın bir şekilde spermatozoa kriyoprezervasyonu amacıyla kullanılmaktadır (Bogart ve Mayer, 1950; Amirat ve ark., 2004). Tavuk yumurta sarısı düşük-dansiteli lipoprotein, fosfolipid ve kolesterolden zengin olması sebebiyle soğuk şokuna direnci artırır (Quinn ve ark., 1980; Graham ve Foote, 1987; Moussa ve ark., 2002). Yumurta sarısı bu nedenlerle birçok domestik ve egzotik hayvan spermatozoonlarının kriyoprezervasyonu sırasında kullanım alanı bulmuştur (Holt, 2000).

Farklı kanatlı türlerinin (ördek, bildircin, güvercin ve tavuk) yumurta sarıları farklı yağ asidi, fosfolipid ve kolesterol içeriklerine sahiptir ve bu nedenle spermatozoa üzerinde farklı kriyoprezervatif etkileri bulunmaktadır (Surai ve ark., 1999; Bathgate ve ark., 2006; Clulow ve ark., 2007; Su ve ark., 2008). Ördek (*Anas domestica*) yumurta sarısı katılmış sulandırıcı ile dondurulan aygır spermasında çözündürme sonrası motilite oranı tavuk yumurta sarısına göre daha yüksek olarak belirlenmiştir (Clulow ve ark., 2007). Su ve ark. (2008), güvercin yumurta sarısının boğa spermasının kriyoprezervasyonu sırasında, progresif motilite ve canlılık oranları yönünden diğer kanatlı yumurta sarılarına göre (tavuk, ördek, kaz ve bildircin) daha yüksek iyileştirme sağladığını bildirmişler ve güvercin yumurtası ilavesinin tavuk yumurtasına alternatif olabileceği ancak fertilite özellikleri yönünden daha fazla çalışmaların yapılmasının gerektiğini vurgulamışlardır. Akhter ve ark. (2010) da güvercin yumurtasının dondurma-çözündürme sonrasında boğa spermatozoonunun motilite, membran ve akrozom bütünlüğü yönünden beç tavuğu ve evcil tavuk yumurtasına göre daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

Memeli sperması normalde katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve glutasyon (GSH) gibi antioksidan enzim ve maddeleri içerir (Mann ve Lutwak-Mann, 1981; Kantola ve ark., 1988). Glutasyon (L-g-glutamil-L-sisteinilglisin) tiyol grubu içeren bir tripeptid olup hücre fizyolojisinde ve metabolizmasında önemli rollere sahiptir; hücreyi oksidatif hasardan korur, protein ve DNA sentezinde ve gamet hücre fertilizasyonunda koruyucu etkinliği vardır (Nasr-Esfahani ve Johnson, 1992; Irvine, 1996). Glutasyon, GPx ile ilişkili olarak antioksidan etkinlik gösterir. Ancak bu sınırlı endojen antioksidan kapasite dondurma-çözündürme sırasında oluşan fazla ROS ve LPO'dan hücreyi korumada yeterli olmamaktadır (Aurich ve ark., 1997). Bu nedenle araştırmacılar

dondurma-çözdürme sonrasında spermatozoanın fazla ROS ve LPO'nun istenmeyen etkilerinden korunabilmesi için farklı antioksidan maddeler denemişlerdir.

Metiyonin GSH'nın prekürsör amino asiti olarak hücreleri oksidatif hasardan koruma amacıyla kullanılmıştır ve detoksifikasyonda etkilidir (Reed ve Orrenius, 1977; Reed, 1990). İçerdiği tiyol gurubu sayesinde metiyonin kurşun ile şelat oluşturarak dokulardan uzaklaştırılmasını sağlar (Patra ve ark., 2001). Çoyan ve ark. (2010), tavuk yumurtası içeren koç sperm sulandırıcısına eklenen metiyoninin 72 saat - kısa süreli saklamada motiliteyi kontrole göre yükselttiğini belirlemişlerdir. Yine başka bir çalışmada, sulandırıcıya eklenen metiyoninin dondurma-çözdürme sonrası boğa spermatozoonu DNA hasarını iyileştirdiği belirlenmiştir (Bucak ve ark., 2010).

Trehaloz hücre içindeki suyun dış ortama çıkışını sağlayarak dondurma sırasında meydana gelen buz kristali oluşumunu azaltır. Enerji kaynağı olarak ve ozmotik basıncı düzenleyerek kriyoprotektif etkinlik gösterir (Garcia ve ark., 1989; Abdelhakeam ve ark., 1991). Şekerlerin dondurma-çözdürme sırasında meydana gelen soğuk şokunun önlenmesinde antioksidatif ve kriyoprotektan özelliklerinin olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Woelders ve ark., 1997; Malo ve ark., 2010).

Sunulan çalışmada, tavuk yumurtasına göre motilite, canlılık oranları, akrozom ve membran bütünlüğü yönünden daha iyi koruyucu etkinliği bildirilen güvercin yumurta sarısıyla hazırlanmış Tris sulandırıcısına eklenen metiyonin ve trehalozun spermatozoon motilitesi, membran bütünlüğü ve akrozom bütünlüğü ile LPO, GSH düzeyleri ve GPx aktivitesi üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Spermaların alınması, sulandırılması ve dondurulması

Çalışmada, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi çiftliğinde aynı bakım ve beslemeye tabi tutulan 3 adet 1-2 yaşlı Konya Merinosu ırkı koçlara ait ejakulatlar kullanıldı. Koçlardan toplamda 50 adet ejakulat, aşım sezonunda (yetiştirme mevsimi) haftada iki kez olmak üzere suni vajen yardımıyla alındı, ejakulatlardan 0.5-2 ml hacme, %80'in üzerinde motiliteye, 3×10^9 spermatozoa/ml'nin üzerinde yoğunluğa sahip olanlar miks yapılarak 37 °C'lik su banyosuna aktarıldı. Sulandırıcı olarak Tris-temel sulandırıcısı (Tris 297.58 mM, sitrik asit 96.32 mM, fruktoz 82.66 mM, güvercin yumurta sarısı 15% (v/v), gliserol 5% (v/v), pH 6.8) kullanıldı. Miks yapılan ejakulatlar 3 eşit hacme bölünerek, L-methionine 2 mM (M 5308 Sigma–Aldrich) ve trehalose 25 mM (T 0167 Sigma–Aldrich) içeren Tris sulandırıcısıyla ml'de yaklaşık 4×10^8 spermatozoa olacak şekilde 37 °C'de sulandırıldı. Kontrol grubu için Tris-temel sulandırıcısı ile sulandırılan spermatozoa kullanıldı. Bunu izleyen süreçte numuneler sıvı azot buharında kademeli olarak dondurularak sıvı azot içerisinde (-196 °C) saklandı (Başpınar ve ark., 2011).

Çalışmada dondurma-çözdürme sonrası numuneler spermatolojik parametreler (motilite, HOST ve akrozom bütünlüğü) ve biyokimyasal parametreler (LPO, GSH düzeyleri ve GPx aktivitesi) yönüyle değerlendirildi.

Spermatolojik parametrelerin değerlendirilmesi

Spermatozoa motilitesi

Spermatozoa motilitesi 37 °C'de ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopun 100x büyütmesinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 4 mikroskop sahasına bakılarak yapıldı. Sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması motilite oranı olarak kaydedildi.

Membran bütünlüğü - Hipo-ozmotik Şişme Testi (HOST)

Plazma membranının fonksiyonel bütünlüğünün belirlenmesi için HOS-test uygulandı. Hipo-ozmotik şişme testi, hipoozmotik sıvının 300 µl'sinin 30 µl sperma numunesiyle karıştırılarak 37 °C'de bir saat bekletilmesiyle yapıldı, bu karışımdan yapılan frotide faz-kontrast mikroskopta, en az 5 farklı mikroskop alanında 200 spermatozoa sayıldı, bunlardan kıvrık ve şişmiş kuyruğa sahip olanlar % olarak ifade edildi (Bucak ve ark., 2009).

Spermatozoon akrozom bütünlüğü

Spermatozoa akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi için Nagy ve ark. (2003)'dan modifiye edilmiş FITC-PNA (Fluorescein isothiocyanate conjugated to Arachis hypogaea/Propidium iodide) floresan boyası uygulandı. Bunun için 37 °C'deki 60 µl sperma numunesi (25 x 10⁶ spermatozoa / ml) üzerine FITC-PNA (100 µg FITC-PNA/ 1 ml PBS) temel çözeltisinden 10 µl ve PI çözeltisinden (2 mg PI / 1 ml distile su) çözeltisinden 2 µl ilave edilip, karanlık ortamda 37 °C'de 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numune 10 µl Hancock sıvısıyla tespit edildi. Numuneden alınan 2 µl hacim, lam-lamel arasında akrozom bütünlüğü yönünden floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskopta değerlendirildi (Leica DM3000, Germany). Akrozomu yeşil floresan boya alanlar hasarlı akrozoma sahip spermatozoayı, akrozomu yeşil floresan boya almayanlar ise sağlam akrozoma sahip spermatozoa olarak kaydedildi.

Biyokimyasal Analizler

Ejakülatlar 800 g x 20 dk x +4 °C'de santrifüj edilerek seminal plazmaları ayrımlandı sonra dipteki spermatozoa üzerine PBS ilave edilerek karıştırıldı, 800 g x 10 dk +4 °C'de santrifüj edilerek üstteki sıvı uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi 2 defa tekrar edildi. Yıkama işleminin sonunda dipteki spermatozoa pelleti analize kadar -86 °C'de saklandı. Spermatozoa 500 µl PBS ile tamamlanarak 2 ml'lik tüpler içinde 10 sn süreli, 30 sn soğutmalı, 6 tekrarlı sonikasyon işlemine tabi tutuldu (Bandelin Sonopuls, Bandelin Electronic Heinrichstraße, D-12207, Geräte- Typ:UW 2070, Pro-Nr. 51900037369.004, Berlin). Bu uygulama ile spermatozoonun tamamının kuyrukları parçalandı. LPO analizi için 120 µl homojenat üzerine 10 µl, 0,5 mM butyl-hydroxitoluen (B1378 BHT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) eklenerek analiz yapılmaya kadar -86 °C'de bekletildi. Kalan homojenat 8000 x g'de 15 dk santrifüj edilerek üstteki süpernatant GPx ve GSH analizleri için -86 °C'de saklandı.

LPO düzeyleri ticari LPO-586TM Oxis Research (Bioxytech, CA, USA) kiti ile spektrofotometrik olarak belirlendi (UV 2100 UV-VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japan). Analiz 45 °C'de N-methyl-2-phenylindole adlı kromojen maddenin MDA ve 4-hydroxyalkenals ile reaksiyonuna dayanmaktadır. 1 mol MDA ya da 4-hydroxyalkenal 2 mol N-methyl-2-phenylindole ile reaksiyone girmekte ve 586 nm'de dayanıklı bir kromofor meydana getirmektedir. Sonuçlar µmol (10⁹ hücre/ml) olarak verildi.

GPx düzeyleri ticari GPx-340TM Oxis Research (Bioxytech, CA, USA) kiti ile spektrofotometrik olarak belirlendi. GPx tarafından organik peroksitlerin reaksiyonu sonucu oluşan okside GSH, GR tarafından tekrar redükte edilmektedir. Reaksiyon aşamasında NADPH'ın NADP⁺'ye dönüşümü 340 nm'de azalan absorbansa neden olmaktadır. Azalan absorbans düşüşüyle GPx aktivitesi ters orantılıdır. Sonuçlar mU/ ml (10⁹ hücre/ml) olarak verildi.

Total GSH düzeyleri ticari GSH-420TM Oxis Research (Bioxytech, CA, USA) kiti ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Metod, kromoforik thione oluşumu üzerine temellenmiştir. Örnek içerisindeki okside GSH'ların tamamı redükte hale getirildikten sonra 4-chloro-1-methyl-7 trifluoromethylquinolinium methylsulfate adlı kromojen örnekte bulunan tüm tiol grupları ile tiyoeterler oluşturur. Sonuçlar mmol (10⁹ hücre/ml) olarak verildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışma 7 kez tekrarlandı. Sonuçlar Ort±SH olarak verildi. SPSS/PC (sürüm 12.0; SPSS, Chicago, IL) paket programı ile grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), aralarındaki önemi belirlemek için de Duncan testi kullanıldı. Farklılığın p<0.05 düzeyde olması önemli kabul edildi.

Araştırma Bulguları

Güvercin yumurta sarısı ve antioksidanların biyokimyasal parametrelere ve sperm parametrelerine etkileri Çizelge 1 ve 2'de gösterilmektedir.

Çizelge 1. Güvercin yumurta sarısı ve antioksidanların biyokimyasal parametrelere etkileri

Gruplar	LPO ($\mu\text{mol}\cdot 10^9$ hücre/ml)	GPx (mU/ml-10 ⁹ hücre/ml)	GSH (mmol-10 ⁹ hücre/ml)
Kontrol	81.3±7.6 ^{ab}	11.1±1.5	712.4±46.5
Metiyonin	103.6±12.6 ^a	10.8±1.4	811.4±104.8
Trehaloz	66.2±9.5 ^b	11.2±1.5	670.4±41.8
p	*	-	-

a-b, aynı sütundaki farklı harfler istatistiği olarak önemlidir (* P < 0.05).

Biyokimyasal parametreler yönünden incelendiğinde, Metiyonin grubu LPO düzeylerinin, Kontrol ve Trehaloz gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlendi (P<0.05). Diğer parametreler yönünden bir farklılık belirlenmedi.

Çizelge 2. Güvercin yumurta sarısı ve antioksidanların sperm parametrelerine etkileri

Gruplar	Motilite %	HOS-T (Membran Bütünlüğü)	FITC/PI boyama % (Akrozom bütünlüğü)
Kontrol	48.0±3.4	57.0±1.2	36.7±3.2 ^a
Metiyonin	56.0±3.3	62.0±1.2	50.0±3.0 ^b
Trehaloz	54.0±4.0	60.0±2.2	48.5±3.6 ^{ab}
p			*

*= a-b, aynı sütundaki farklı harfler istatistiği olarak önemlidir (P < 0.05).

Sperm parametreleri yönünden, yalnızca Metiyonin grubu akrozom bütünlüğü Kontrol grubuna göre yüksek (p<0.05) bulundu.

Tartışma

Kriyoprezervasyon teknikleri ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda, dondurma çözündürme sırasında meydana gelen canlı spermatozoon kayıplarını önlemede çok az ilerleme kaydedilebilmiştir (Holt, 2000; Watson, 2000). Bu durum soğuk şoku, kristal buz oluşumu, ozmotik stres veya oksidatif stresle ilişkilendirilmektedir (Bailey ve ark., 2000; Watson ve ark., 1995). Spermatozoayı soğuk stresinin etkilerinden korumak amacıyla tavuk yumurtası uzun yıllardır kullanım alanı bulmuştur. Ancak son yıllarda farklı kanatlı türlerinin yumurtalarından oluşan sulandırıcıların kriyoprezervasyondaki olası etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Bıldırcın yumurta sarısının (%20'lik konsantrasyonda) tavuk ve ördek yumurta sarılarına göre daha yüksek çözüm sonu motilite oranı verdiği bildirilmiştir (El-Sheshtawy ve ark., 2010). Farklı yumurta sarılarının etkinliğinin tavuk yumurtasına göre çözüm sonu daha yüksek motilite verdiği yaban domuzu (Bathgate ve ark., 2006), eşek (Trimeche ve ark., 2007) ve aygır (Clulow ve ark., 2004) spermalarında gösterilmiştir. Güvercin yumurta sarısının, tavuk yumurta sarısına oranla motilite, canlılık oranı, akrozom ve membran bütünlüğü yönünden daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Su ve ark., 2008; Akhter ve ark., 2010). Bu tür farklılıkların yumurta sarılarının içerdiği yağ asidi, fosfolipid ve kolesterol düzeylerinin farklılığından kaynaklanabileceği vurgulanmaktadır (Surai ve ark., 1999; Bahtgate ve ark., 2006; Clulow ve ark., 2007; Su ve ark., 2008).

Koç sperması dondurulma işlemi sırasında soğuk şokuna karşı aşırı duyarlılık gösterdiğinden çözüm sonrası in vitro ve in vivo spermatolojik fonksiyonları diğer türlere göre daha yüksek oranda olumsuz etkilenmektedir (Aitken ve Fisher 1994; Gandini ve ark., 2000). Koç spermatozoon membranı diğer türlere göre daha yüksek poliansatüre/satüre yağ asidi oranına sahiptir (Evans ve Maxwell, 1987; Saleh ve Agarwal, 2002). Spermatozoa plazma membranı ve sitoplazmasında doymamış yağ asitleri arttıkça ROS'a duyarlılık artar (Alvarez ve Storey, 1992). Lipit peroksidasyon ürünleri hem membran bütünlüğüne hem de DNA hasarına yol açar. Enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar spermatozoon membranlarını LPO'dan korurlar (Nasr-Esfahani ve Johnson, 1992; Irvine, 1996). Spermatozoanın dondurulma-çözündürülmesi, membranlarda faz değişimine bağlı hasarlara ve oksidatif strese neden olmaktadır (Aitken ve Fisher, 1994). Bu nedenlerle sperma sulandırıcılarına katılan koruyucu ve antioksidan özellikli maddelerle ortamda gelişecek soğuk şoku hasarı minimize edilebilir.

Sunulan çalışmada güvercin yumurta sarısı ile hazırlanan sulandırıcıya eklenen metiyonin, motilite oranını değiştirmeksizin, akrozom bütünlüğünü kontrol grubuna göre önemli düzeyde iyileştirdiği görüldü. Ayrıca metiyoninin istatistiksel olarak önemli bulunmasa da membran bütünlüğünde de koruyucu etkinliği gözlemlendi. Bucak ve ark. (2010), tavuk yumurtasına eklenen metiyoninin dondurma-çözündürme sonrası boğa spermasında daha düşük DNA hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Çoyan ve ark. (2010), tavuk yumurtasına eklenen metiyoninin, koç spermasının 72 saatlik kısa süreli saklanması sırasında, motiliteyi kontrole göre iyileştirdiğini, ancak LPO ve GSH düzeylerinin ise metiyoninin farklı dozlarından etkilenmediğini bildirmişlerdir. Metiyonin, GSH'nın prekürsör amino asiti olarak hücreleri oksidatif hasardan korumaktadır (Reed ve Orrenius, 1977; Reed, 1990). Fakat sunulan çalışmada metiyoninin, GPx aktivitesi ile LPO ve GSH düzeylerini kontrol grubuna göre önemli düzeyde değiştirmedeği görüldü. Metiyonin ile kısa süreli saklama süresince inkübe edilen koç sperma örneklerinin kontrol grubuna göre daha yüksek oranda tokoferol içerdiği bildirilmiş (Kaludin ve Dimitrova, 1986), ayrıca tokoferol eklenen sperma sulandırıcılarının hindi spermatozoon motilitesini, canlılığını ve membran bütünlüğünü koruduğu bildirilmiştir (Donoghue ve Donoghue, 1997). Sunulan çalışmada, metiyoninin akrozom ve membran bütünlüğü üzerinde koruyucu etkisinin tokoferol etkinliği üzerinden olabileceği düşünülebilir. Hücre içindeki

suyun dışarı atılmasını sağlayarak dondurma sırasında meydana gelen buz kristali oluşumunu azaltıcı etkisi ile kriyoprezervatif etkinliği olan trehaloz da istatistiksel olarak önemli düzeyde olmasa da akrozom bütünlüğünü kontrol grubuna göre iyileştirmiştir. Bu sonuçlara göre dondurma-çözdürme sonrası meydana gelen olumsuz etkilerde LPO'nun majör bir faktör olmadığı düşünülebilir. Ancak Baumber ve ark. (2000), artan ROS düzeyleri ile spermatozoon motilitesi arasında negatif bir korelasyon bildirmiştir. Çalışmalardaki farklı sonuçların, kullanılan hayvan türlerine ait spermaların oksidatif strese duyarlılığının farklı olması ve metodolojinin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak güvercin yumurta sarısı ile sulandırılmış koç spermasına eklenen metiyoninin, dondurma-çözdürme sonrası akrozom bütünlüğünü koruduğu görülmüştür.

Kaynaklar

- Abdelhakeam, A. A., Graham, E. F., Vazquez, I. A., Chaloner, K. M. (1991). Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology*, 28, 43-49
- Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D. L., Twigg, J. P., Milne, P., Jennigs, Z., Irvine, D. S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 59, 1037-1046
- Aitken, R. J., Fischer, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays*, 16, 259-67
- Akhter, S., Rakha, A. B., Andrabi, S. M. H., Ansari, M. S. (2010). Comparison of egg yolks from three avian species in extender for cryopreservation of Sahiwal bull epididymal spermatozoa. *Anim. Sci. Papers Rep.*, 29(2); 131-138
- Alvarez, J. G., Storey, B. T. (1983). Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.*, 29, 548-555
- Alvarez, J. G., Storey, B. T. (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.*, 13, 232-241
- Alvarez, J. G., Storey, B. T. (2005). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 334-46
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., Courtens, J. L., Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61, 895-907
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capaciting phenomenon. *J. Androl.*, 21, 1-7
- Bathgate, R., Maxwell, W. M., Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reprod. Domest. Anim.*, 41, 68-73
- Başpınar, N., Çoyan, K., Bucak, M. N., Ömür, A. D., Ataman, M. B., Akalın, P. P., Güngör, Ş., Öztürk, C. (2011). Koç spermasının ekilibasyon ve dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine lipoik asitin etkisi. *Eurasian J. Vet. Sci.*, 27, 87-92
- Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V., Davies-Morel M. C. G. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.*, 21, 895-902
- Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S., Ulutas, P. A. 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities, *Small Rum. Res.*, 81, 13-17
- Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Peker Akalın, P., Çoyan, K., Büyükleblebici, S., Aydos, S., Ilgaz, S. (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage, *Cryobiology*, 61, 248-253

- Bogart, R., Mayer, D. T. (1950). The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. *J. Anim. Sci.*, 9, 143-152
- Clulow, J. R., Maxwell, W. M. C., Evans, G., Morris, L. H. A. (2007). A comparison of duck and chicken egg yolk for the cryopreservation of stallion sperm. *Aust. Vet. J.*, 85, 232-235
- Çoyan, K., Başpınar, N., Bucak, M. N., Peker Akalın, P., Ataman, M. B., Ömür, A. D., Güngör, Ş., Küçükünay, S., Özkalp, B., Sarıözkan, S. (2010). Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Res. Vet. Sci.*, 89, 426-431
- Donoghue, A. M., Donoghue, D. J. (1997). Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult. Sci.*, 76, 1440-1445
- El-Sheshawy, R. I., El-Sisy, G. A., Mohamed, A. A., El-Natat, W. S. (2010). Effect of egg yolk from different avian species on cryopreservability of buffalo semen. *Glob. Biotech. Biochem.*, 5, 211-215
- Evans, G., Maxwell, W. M. C. (1987). Handling and examination semen. In: Maxwell WMC (Ed), Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat. Butterworths. 93-106 s. Sidney
- Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlegia, C. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 15, 830-839
- Garcia, M. A., Graham, E. F. (1989). Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effect of sugars and sugar alcohols on postthaw motility. *Theriogenology* 31, 1029-37
- Graham, J. K., Foote, R. H. (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24, 42-52
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53, 47-58
- Irvine, D. S. (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod.*, 1, 6-12
- Kaludin, I., Dimitrova, I. (1986). Effect of selenium and DL-methionine on the zinc and tocopherol content of the seminal fluid in rams. *Vet. Med. Nauki.*, 23, 41-46
- Kantola, M., Saaranen, M., Vanha-Perttula, T. (1988). Selenium and glutathione peroxidase in seminal plasma of men and bulls. *J. Reprod. Fertil.*, 83, 785-794
- Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Cano, R., Blas, I., Espinosa, E. (2010). Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology*, 61(1); 17-21
- Mann, T., Lutwak-Mann, U. C. (1981). Male reproductive function and semen, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Medeiros, C. M., Forell, F., Oliveira, A. T., Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*, 57,327-344
- Moussa, M., Marinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57, 1695-1706
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., Gadella, B. M. (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.*, 68, 1828-1835
- Nasr-Esfahani, M. H., Johnson, M. H. (1992). Quantitative analysis of cellular glutathione in early preimplantation mouse embryos developing in vivo and in vitro. *Hum. Reprod.* 7, 1281-1290
- Patra, R. C., Swarup, D., Dwivedi, S. K. (2001). Antioxidant effects of alpha-tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*, 162, 81-88
- Polge, C., Smith, A. U., Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 166
- Quinn, P. J., Chow, P. Y., White, I. G. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60, 403-407
- Reed, D. J. (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 603-631
- Reed, D. J., Orrenius, S. (1977). The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 1257-1264

- Saleh, R. A., Agarwal, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.* 23, 737-752
- Su, L., Li, X., Quan, X., Yang, S., Li, Y., He, X., Tang, X. (2008). A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 212-219
- Surai, P. F., Speake, B. K., Noble, R. C., Mezes, M. (1999). Species-specific differences in the fatty acid profiles of the lipids of the yolk and of the liver of the chick. *J. Sci. Food. Agric.* 79, 733-736
- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G., Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*, 34, 385-393
- Vishwanath, R., Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 23-53
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 871-891
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 481-492
- Woelders, H., Matthijs, A., Engel, B. (1997). Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*, 35, 93-105