

**ANKARA TEKESİ SPERMASININ DONDURULMASINDA BAZI
KRYOPROTEKTANLARIN ETKİSİ***
(Effect of Some Cryoprotectants in Cryopreservation of Angora Buck Semen)

Mustafa Numan BUCAK¹

Necmettin TEKİN²

¹ Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü- Lalahan Ankara

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama ABD- Ankara

Geliř Tarihi : 06.03.2008

Kabul Tarihi : 22.05.2008

ÖZET

Bu çalışmanın amacı Ankara keçisi tekesi sperması sulandırıcısına ilave edilen bazı kriyoprotektanların spermanın dondurulup çözdürülmesi sonrası spermatolojik parametrelere etkisinin araştırılması olmuştur. Çalışmada, 3 baş ergin Ankara keçisi tekesinden alınan ejakülatlar kullanılmıştır. Ejakülatlar çiftleştirme mevsiminde sun'i vajen kullanılarak haftada iki kez, beş hafta süresince toplanmıştır. Alınan ejakülatlar birleştirildikten sonra 4 eşit hacme bölünmüş ve 37°C'taki su banyosunda kriyoprotektan içeren [100 mM trehaloz + 0.015 g/10 ml EDTA, 5 mM okside glutatyon (GSSG) ve trehaloz + EDTA + GSSG (kombine)] ve içermeyen (kontrol) temel sulandırıcıyla sulandırılmıştır. Sulandırılan spermalar payetlere (0.25 ml) çekilerek 5°C'ta ekilibrasyona bırakılmıştır. Ekilibrasyonu izleyen süreçte payetler sıvı azot buharında dondurularak daha sonra değerlendirilmek üzere -196°C'taki sıvı azotta saklanmıştır.

Çözüm sonu spermatozoa motilitesinde, GSSG ve kombine gruplarında (%53.7±3.7 ve 46.2±1.2) kontrol grubuna (%42.5±3.2) göre önemli farklılık çıkmamıştır. Fakat trehaloz+EDTA içeren grup spermatozoa motilitesini diğer gruplara göre önemli oranda kötüleştirmiştir. Anormal spermatozoada kriyoprotektan içeren gruplar (trehaloz+EDTA, GSSG, kombine; %10.5±0.9, 13.2±0.9, 8.0±0.9) arasında istatistiksel olarak farklılıklar önemsiz olurken, kriyoprotektan içeren gruplarda kontrol grubuna (%21.5±1.3) göre oldukça düşük oranlar elde edilmiş ve aradaki farklılıklar önemli (P<0.05) olmuştur. GSSG içeren grupta ölü spermatozoa bakımından en düşük oran (%30.0±2.0) elde edilmiştir (P<0.05). Hipoozmotik şişme testinde GSSG ve kombine grupları en yüksek oranı vermişlerdir (%40.5±2.7 ve 27.0±1.4) (P<0.05). Sonuç olarak, Ankara keçisi tekesi sperması sulandırıcısına katılan kriyoprotektanların (GSSG, trehaloz + EDTA ve trehaloz+ EDTA+ GSSG grupları) çözüm sonrası bazı spermatolojik parametreler üzerine önemli katkılar sağladığı görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Kriyoprotektan, kriyoprotektif etki, spermanın dondurulması, spermatolojik parametreler, Ankara tekesi.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of some cryoprotectants added to extender of Angora buck semen on spermatologic parameters after frozen-thawed semen. Ejaculate samples obtained from three mature Angora bucks were used in this study. Ejaculates were collected using an artificial vagina twice a week, for five weeks running, during the reproductive season. After pooling, each pooled ejaculate was split into four equal aliquots and diluted with based extender containing cryoprotectants [100 mM trehalose + 0.015 g/10 ml EDTA, 5 mM GSSG and trehalose + EDTA + GSSG (combined)], or no cryoprotectants (control) at 37°C. Diluted samples were aspirated into 0.25 ml straws, equilibrated at 5°C. Following equilibration, the straws were frozen in liquid nitrogen vapour and stored at -196°C so as to be evaluated.

Post-thawed spermatozoa motility did not exist significant difference at the groups with GSSG and combined (53.7±3.7%, 46.2±1.2%), compared to the control (42.5±3.2%). But groups including trehalose+EDTA significantly deteriorated the spermatozoa motility, compared to the other groups. At abnormal spermatozoa rates, while there were not statistically differences among the groups including cryoprotectants (trehalose+EDTA, GSSG, combined; 10.5±0.9%, 13.2±0.9%, 8.0±0.9%, respectively), at these groups fairly low rates (21.5±1.3%) were obtained in comparison to control, and differences between groups containing cryoprotectants and no cryoprotectants became important (P<0.05). Dead spermatozoa with the lowest rate was attained at group with GSSG. At HOST, GSSG and combined groups gave the highest rates (40.5±2.7% and 27.0±1.4%, P<0.05). In conclusion, it was seen that cryoprotectants added to extender of Angora buck semen provided the significant contributions on some spermatological parameters after thawing.

Key words: Cryoprotectant, cryoprotective effect, semen cryopreservation, spermatologic parameters, Angora buck

*Bu çalışma aynı başlıklı doktora tezinden hazırlanmıştır.

GİRİŞ

Ankara Keçisi (*Capra prisca*), 13. yüzyılda Türklerin Hazer Denizinin doğusundan Anadolu'ya beraberlerinde getirdiği bir keçi ırkı olarak bilinmektedir. Ankara keçisi uluslar arası arenada tekstil endüstrisinde ham madde ihtiyacını karşılamak amacıyla tiftik üretimi ve yavru verimi için yetiştirilmektedir. Türkiye Cumhuriyeti'nin kuruluş yıllarında artış gösteren tiftik keçisi varlığı 1960'lı yıllara kadar bu artışını sürdürmüş, 1980'li ve 1990'lı yıllarda hızlı bir şekilde düşüş göstermiştir. Günümüzde Anadolu'da Ankara keçisi yetiştirilmesinin başlıca nedeni, yetiştiricilerin geleneksel değerlere bağlılığıdır (19, 32).

Sun'i tohumlama entansif keçi üretim ve yetiştiriciliğinde önemli olmakla birlikte, dondurulmuş spermanın servikal tohumlamada kullanımı henüz tatmin edici sonuçlar vermemektedir. Spermanın dondurulması spermatozoonda yapısal, biyokimyasal ve fonksiyonel hasara neden olarak, spermatozoon motilitesi, canlılığı ve fertilitesinde düşüslere neden olmaktadır (30, 37).

Spermanın dondurulmasında kullanılan sulandırıcıda kriyoprotektif özellikli maddelerin bulunması gereklidir. Kriyoprotektanlar hücrenin soğutulması ve dondurulması esnasında gelişen fiziksel, kimyasal ve oksidatif stres hasarlarını (ısı şoku ve ozmotik değişim hasarı, intraselüler kristal oluşumu, serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun oluşturduğu hasarlar) azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. İnternal özellikli kriyoprotektanların yanısıra, bazı eksternal kriyoprotektanların (sakkaritler, antioksidanlar, EDTA) hücre dışında kriyoprotektif etki gösterdikleri son zamanlarda anlaşılmış, sperma sulandırıcılarında kullanılmaya başlanmıştır (4, 9, 17, 21).

Eksternal kriyoprotektanlar (hücreye penetrasyon özelliğine sahip olmayanlar) ekstraselüler etkilerinden dolayı, hücre membranındaki esnekliğinin kaybını önledikleri, membran proteinlerinde stabilizasyon sağladıkları, ekstraselüler ortamda gelişen kristalizasyonu azalttıkları ve gelişen lipid peroksidasyonunu minimize ettikleri bilinmektedir (15, 31, 37).

Eksternal kriyoprotektan olarak görev yapan sakkaritlerden trehaloz, iki D-glikoz molekülünün bağlanmasıyla oluşmuş bir disakkarit bileşimidir (38). Tam olarak etki mekanizması bilinmemekle birlikte, spermatozoa plazma membranına penetre olduğu, donma ve çözüm esnasında membran fosfolipitlerinin polar baş gruplarıyla hidrojen bağları kurarak yüzey artığı sağladığı ve ozmotik tamponlayıcı göreviyle ozmotik şoka karşı koruyucu etkinlik gösterdiği, serbest oksijen radikallerinin salınımını azalttığı ileri sürülmektedir (1, 4, 23, 31, 37).

Son yıllarda trehaloz memeli spermasının dondurulmasında sulandırıcıya katılmaya başlanmış, çözüm sonrası spermatolojik parametreler (motilite, akrozom ve membran bütünlüğü) ve antioksidan kapasitenin artırılması ve lipid peroksidasyonunun azaltılması üzerinde önemli etkinlik sağladığı gösterilmiştir (1, 2, 3, 12, 37).

Serbest oksijen radikallerinin toksik etkilerine karşı koymak için, spermatozoa ve seminal plazma lipid peroksidasyonuna karşı bir takım antioksidanları içermektedir (5, 26, 35). Fakat bu antioksidan sistemi, serbest oksijen radikallerinin olası toksik etkilerine ve oksidatif hasara karşı koymada yeterli gelmemektedir. Bunun yanısıra dondurma ve çözündürme işlemlerinin, spermada bulunan antioksidan aktiviteyi düşürdüğü saptanmıştır (10, 16, 22).

Glutasyonun sulandırıcılara katılması, ortamda bulunan serbest oksijen radikalleriyle reaksiyona girerek ve donma esnasında membran proteinlerindeki sülfür gruplarında gelişen bozulma ve dağılmayı kısmen önleyerek oksidatif hasara karşı koruyucu etkinlik oluşturmaktadır (16, 40). Yapılan çalışmalarda glutasyonun spermanın çözüm sonrası ve kısa süreli saklanması sırasında motilite, akrozom bütünlüğü ve antioksidan aktivite üzerinde önemli katkılar sağladığı bildirilmiştir (13, 41).

EDTA permeabl olmayan bir şelat özelliğinde olduğundan, spermatozoon motilitesinde zararlı bir etkisi olmadığı bildirilmektedir. İnsan spermasında yapılan çalışmalarda sulandırıcıya katılması, spermatozoonun inkübasyonunda motil kalma süresine katkı sağladığı belirtilmiştir (29, 43). EDTA'nın buradaki etkisi, spermatozoon üzerinde toksik etki gösteren ortamdaki bazı metallerle (kalsiyum, çinko) şelat oluşturarak ortamdaki metal yoğunluğunu düşürmesi, bu nedenle de motiliteyi iyileştirmesi yönüyledir (39). Tekelerde sulandırıcıya 1mg/ml dozunda EDTA'nın ilavesinin çözüm sonrası spermatozoon motilitesini artırdığı gösterilmiştir (28).

Yapılan bu çalışmasının amacı, Ankara keçisi tekesi sperması sulandırıcısına katılan kriyoprotektanlarla çözüm sonrası spermatozoon parametrelerinin iyileştirilmesi olmuştur.

MATERYAL VE METOT

Hayvan materyali ve spermanın alınması

Bu çalışmada 2-3 yaşlı 3 ergin Ankara keçisi tekesinden alınan spermalar kullanılmıştır. Tekelerin bakım ve beslemesi Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünde standart yetiştirme koşullarında yapılmıştır. Spermalar, çiftleştirme mevsiminde (sonbahar) suni vajen yardımıyla haftada iki kez, beş hafta süresince alınmıştır. Alınan

ejakülatlardan uygun özellik (sperma yoğunluğu $\geq 3 \times 10^9$ spermatozoa/ml; motilite $\geq 90\%$) gösterenler miks haline getirilerek spermanın dondurulmasında kullanılmıştır.

Spermanın sulandırılması ve dondurulması

Ejakülatların sulandırılmasında Tris sulandırıcı (375 mM tris, 41,625 mM glikoz, 124 mM sitrik asit, % 9 yumurta sarısı, gliserol %6) kullanılmıştır. Miks yapılan ejakülatlar 4 eşit hacme bölünerek trehaloz (100 mM) + EDTA (0.015 g/10 ml), okside glutasyon (GSSG, 5 mM), trehaloz + EDTA + GSSG içeren ve kriyoprotektan içermeyen tris sulandırıcısıyla ml'de yaklaşık 8×10^8 spermatozoa olacak şekilde sulandırılmıştır. Sulandırıcılarla sulandırma işlemi takiben sperma numuneleri 0.25 ml'lik payetlere çekilerek 2.5 saat $+5^\circ\text{C}$ 'ta ekilibrasyona bırakılmıştır. Ekilibrasyonu izleyen süreçte sıvı azot buharında ($\sim -100^\circ\text{C}$) dondurularak -194°C 'taki sıvı azotta deşelendirilmek üzere saklanmıştır. En az 24 saat sıvı azotta bekletilen sperma numuneleri 37°C 'ta 30 saniyede çözdürülerek spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı, ölü oranı ve hipoozmotik şişme testi (HOST) yönüyle deşelendirilmiştir.

Spermatozoa motilitesi 37°C 'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopun 100x büyütmesinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 4 mikroskop sahasına bakılarak yapılmıştır. Sahalardaki motilite deşerlerinin ortalaması motilite oranı olarak kaydedilmiştir. Anormal spermatozoa oranı Hancock sıvısına alınan sperma numunesinin faz kontrast mikroskopun immersiyon objektifinde lam-lamel arasına alınan bir damlasında spermatozoa baş, orta, kuyruk ve akrozom kısmı anomalileri % olarak tespit edilmesiyle belirlenmiştir. Spermalarda ölü spermatozoa oranının belirlenmesinde elde eozin-nigrozin boyama sıvısı kullanılmıştır.

Isıtma tablasındaki lam üzerine bir kısım sperma numunesi 4 kısım boyama sıvısı konarak karıştırılmış ve frotileri çekilerek kurutulmuştur. Bu çekilde hazırlanan frotilerde mikroskopta (400X büyütme) 400 spermatozoa sayılarak ölü spermatozoa oranı % olarak belirlenmiştir. Spermatozoon baş kısmının tamamının ya da bir bölümünün boya alması ölü spermatozoa oranını göstermiştir. Plazma membranının fonksiyonel bütünlüğünün belirlenmesi için HOS-test uygulanmıştır. HOS-test, hipoozmotik sıvının 300 µl'sininin 30 µl sperma numunesiyle karıştırılarak 37°C'ta bir saat bekletilmesiyle yapılmıştır. Bu karışımdan yapılan frotide faz kontrast mikroskopun 400x büyütmesinde toplam 400 spermatozoa sayılmış, bunlardan kıvrık ve şişmiş kuyruğa sahip olanlar % olarak ifade edilmiştir (3, 12).

İstatiksel analizler

İstatistik analizlerde 6 farklı uygulamadan elde edilen verilerin ortalamaları kullanılmıştır. Farklı grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis Test, aralarında önemli farklılık bulunan ikiden fazla grubu karşılaştırmak için de Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır. Farklılığın $P<0.05$ düzeyde olması önemli kabul edilmiştir.

Bulgular

Bu çalışmada Ankara keçisi tekesi sperması sulandırıcılarına katılan farklı kriyoprotektanların çözüm sonrası spermatozoonlar üzerindeki etkileri çizelgede gösterilmiştir.

Çözüm sonrası spermatozoa motilitesi GSSG, trehaloz+EDTA+GSSG ve kontrol gruplarında, sırasıyla, %53.7±3.7, 46.2±1.2, 42.5±3.2 olarak saptanmıştır. Trehaloz+EDTA içeren grupta ise bu oran %30.0±2.0 olmuştur. Anormal spermatozoada, kriyoprotektan içeren gruplar birbirlerine göre (trehaloz+EDTA, GSSG, kombine; %10.5±0.9, 13.2±0.9, 8.0±0.9) istatistiksel olarak farklılıklar önemsiz olurken, kriyoprotektan içeren gruplarda kontrol grubuna göre oldukça düşük oran elde edilmiş ve aradaki farklılıklar önemli olmuştur ($P<0.05$). GSSG içeren grupta ölü spermatozoa bakımından en düşük oran (%30.0±2.0) elde edilmiştir. Hipoozmotik şişme testinde ise GSSG ve kombine gruplarının (%40.5±2.7, 27.0±1.4) diğer gruplara (trehaloz+EDTA, kontrol; %11.7±1.8, 16.2±2.0) göre daha yüksek sonuçlar verdiği gözlenmiştir ($P<0.05$).

Çizelge. Dondurulmuş çözdürülmüş Ankara tekesi spermasından çözüm sonrası elde edilen spermatojistik özellikler (n:6)

Gruplar	Motilite (%) X±Sx	Anormal Oran (%) X±Sx	Ölü oranı (%) X±Sx	HOS test (%) X±Sx
Trehaloz+EDTA	30.0±2.0 ^a	10.5±0.9 ^a	59.0±1.9 ^a	11.7±1.8 ^a
GSSG	53.7±3.7 ^b	13.2±0.9 ^a	30.0±2.0 ^b	40.5±2.7 ^b
Trehaloz+EDTA+GSSG (Kombine)	46.2±1.2 ^b	8.0±0.9 ^a	38.0±0.9 ^c	27.0±1.4 ^c
Kontrol	42.5±3.2 ^b	21.5±1.3 ^b	40.7±3.1 ^c	16.2±2.0 ^a
P	*	*	*	*

a,b,c: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir ($P<0.05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Spermatozoondaki membransel yapılar (plazma membranı, dış akrozomal membran ve mitokondri membranı) donma/çözünme işlemine karşı son derece duyarlıdır. Membran yapıları akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitlerle bezeli iki sıralı fosfolipit katmanından oluşmuştur. Bu yapıların termodinamik özellikte ve %65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden oluşması, membranların soğutulması sırasında geri dönüşümsüz faz değişimine, neden olmaktadır (44, 45). Gelişen faz değişimi sonrası bozulan membran stabilizasyonu ile hücrede soğuk şoku hasarı gelişmektedir. Ayrıca membranların doymamış fosfolipitlerce zengin olması, hücrelerin dondurulması sırasında gelişen oksidatif stresle ilişkili olarak hücreleri lipit peroksidasyonuna karşı duyarlı kılmaktadır (25, 44). Bu gelişen olaylar spermatozoon yapısında ve membranlarında değişiklikler gelişerek, hücre motilitesinde, canlılığında ve fertilitesinde düşüşlerle kendini göstermektedir (30).

Sperma hücreleri lipit peroksidasyonunun zararlı etkilerini karşılamak için bazı antioksidanları içermektedir. Fakat bu endojen antioksidanlar spermanın dondurulmasında yeterli gelmemekte, ekzojen antioksidanlara gerek duyulmaktadır. Son yıllarda kriyoprotektif amaçlı olarak sperma sulandırıcılarına ilave edilen antioksidan özellikli kimi maddelerin çözüm sonu parametreler üzerinde etkinlikleri saptanmıştır (8, 24, 26, 27).

Aisen ve arkadaşların koçlarda yaptıkları çalışmalarda sulandırıcıya katılan trehaloz ve EDTA kombinasyonunun bunların tek kullanılmalarına ve kontrol grubuna göre çözüm sonu motilite ve akrozom bütünlüğü oranlarında önemli koruyucu etki sağladığı gösterilmiştir. Bu etkiler, trehalozun belirli oranlarının membran-solüsyon arabiriminde suyla yer değiştirerek donma öncesi ortamda

hücresel dehidrasyona yol açması, membran fosfolipitleriyle direkt olarak etkileşime girerek soğuk şokuna karşı koruyuculuk sağlaması, EDTA'nın ise trehalozun donma derecesini düşürerek sinerjik bir etki yaratmasıyla oluşmuştur (2, 4). Aynı zamanda trehalozun tam olarak etki mekanizması açıklanamamasına rağmen, donma esnasında gelişen ekstraselüler ortama su çıkışının yarattığı hızlı fiziksel ve morfolojik değişikliklere karşı hücre membranlarını dirençli hale getirdiği ve donma sırasında gelişen intraselüler kristal oluşumunu azalttığı bildirilmektedir (1, 7, 20, 34).

Bunun yanısıra trehalozun tekelerde (1) ve koçlarda (12) çözüm sonu spermatozoa motilitesi üzerinde kontrol gruplarına göre önemli oranda iyileşmeler sağladığı belirtilmiştir. Ancak boğalarda yapılan çalışmalar, trehalozun kontrol grubuna göre motilite ve fertilitite oranları üzerinde etkinliğinin olmadığını göstermiştir (17, 20).

Sunulan çalışmada ise kullanılan 100 mM trehalozun aşırı bir hiperozmotik ortam oluşturarak sperma hücrelerinde büzüşmelere neden olduğu ve EDTA'nın bu değişimlerde yeterli ölçüde koruyucu etki sağlamayarak, çizelgede görüldüğü gibi çözüm sonrası spermatozoa motilitesini ve ölü oranını, kontrol grubuna göre koruyamadıkları görülmüştür. Yaptığımız diğer çalışmalarda da sulandırıcıya aynı oranda katılan trehalozun çözüm sonrası motilitede ve kısa süreli saklanan numunelerde spermatozoon yaşamı üzerine önemli katkılar yaptığı gösterilmiştir (13, 14). Sulandırıcıya katılan yüksek yoğunluktaki trehalozun spermatozoonlar üzerindeki yarattığı hasar, hücre dışına aşırı miktarda sıvı çıkışına bağlanabilmektedir (18). Fakat bazı yazarlar, sperma sulandırıcısına katılan yüksek orandaki trehalozun, düşük oranlarına göre soğuk şoku hasarına karşı daha iyi koruma sağladığını belirtmektedir (1, 6, 46). Yapılan çalışmalardaki farklı sonuçların ortaya çık-

ması, sulandırıcıya katılan farklı tris/trehaloz konsantrasyonlarına, türe özgü spermatozoon membran yapılarının farklı özellik göstermesine bağlanabilmektedir. Bu anlamda yaptığımız bazı ön deneme çalışmalarında da sulandırıcıda Tris miktarının 250 mM civarında olması, ortalama 50 mM'dan daha fazla trehalozun katılmaması gerektiğini göstermiştir.

Son yıllarda koçlarda yapılan çalışmalarda trehaloz ve EDTA'in direkt ortamda gelişen lipit peroksidasyonuna karşı koruyuculuk sağlayarak, serbest radikal temizleyiciliği yaptığını göstermiştir (4, 12). Tekelerde yapılan bir araştırmada ortama ilave edilen EDTA'in çözüm sonrası spermada H₂O₂ formasyonunu baskıladığı ve çözüm sonrası spermatozoo motilitesini artırdığı gösterilmiştir (28). EDTA'in buradaki etkisi, seminal plazmada bulunan ve yüksek miktarlarıyla spermatozoon üzerinde toksik etki gösteren bazı metallerle (kalsiyum, çinko) şelat oluşturarak ortamdaki metal yoğunluğunu düşürmesi, bu nedenle de motiliteyi iyileştirmesi yönüyle olmuştur (39).

Tüm bu sonuçlardan bu iki maddenin (trehaloz ve EDTA) ortamda enerji kaynağından ziyade, dondurma-çözdürme işlemi sırasında ekstrasellüler kriyoprotektif-antioksidatif ve ozmotik basıncı düzenleyici etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda kriyoprotektan içeren tüm gruplardan çözüm sonrası elde edilen anormal spermatozoo oranının kontrole göre düşük çıkmasına rağmen, aynı durumun HOST sonuçlarından elde edilememesi, trehalozun etkinliğini düşündürücü kılmaktadır. Aynı durum, çözüm sonu spermatolojik parametreler yönünden Saanen teke spermasının trehalozla dondurulmasından da elde edilmiştir (14).

GSH ve GSSG'un sulandırıcıda varlığı, donma esnasında spermatozoo'dan Salınan enzim oranını/miktarını azaltarak çözüm sonu

motiliteyi ve fertilitiyi artırmakta, akrozomal anomalileri azaltmaktadır (11, 16, 41, 42) Bunun yanı sıra glutatyon ortamda bulunan serbest oksijen radikalleriyle reaksiyona girerek ve donma esnasında membran proteinlerindeki sülfür gruplarında gelişen bozulmayı kısmen önleyerek oksidatif hasara karşı koruyucu etkinlik oluşturmaktadır. (16, 40). Yapılan bu çalışma, sonuçları itibarıyla glutatyonun olumlu etkilerini desteklemekte ve çözüm sonrası en düşük ölü spermatozoo ve en yüksek HOST oranlarıyla glutatyonun kriyoprotektif özelliğini göstermiştir. Bunun yanında trehaloz+EDTA ortamına katılan GSSG, trehaloz+EDTA'in neden olduğu düşük motilite ve HOST oranları ile yüksek ölü spermatozoo oranına olumlu katkısıyla etkinlik göstermiştir.

Teke spermasına ilave edilen redükte glutatyon çözüm sonrası motiliteyi ve akrozom anomalilerini önemli oranda koruduğu gösterilmiştir (41). Fakat domuzlarda yapılan çalışmada sulandırıcıya ilave edilen glutatyonun kontrole göre çözüm sonrası fertilitiyeye önemli katkılar yapmadığı belirtilmiştir (22).

Çalışmada kullanılan GSSG'un trehalozla oluşturulan hipertonic ortamın spermatozoon motilitesi ve morfolojisi üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiyi azaltması antioksidanların spermatozoon morfolojisinde önemli yerinin olduğunu göstermektedir. Hipoozmoik şişme testi (HOST), spermatozoon plazma membranının fonksiyonel bütünlüğünü değerlendirmekte ve sonuçlarının yüksek olması (%50≤), motilite ve in vivo/vitro fertilitie parametreleriyle yakından ilişkilendirilmektedir (33, 36). Sunulan çalışmada GSSG ve kombine grupları en yüksek HOST sonuçlarını vermiştir. Ayrıca, sulandırıcıya ilave edilen trehaloz ortamı hipertonic hale getirerek, çözüm sonrası parametreleri iyileştirmemiştir. Yapılan bazı çalışmalarda trehalozun plazma membran bütünlüğünü kontrol gruplarına göre

koruyamaması, bu araştırma sonuçlarını desteklemektedir (12, 14). Bu durumdan, trehalozun sulandırıcılardaki tris yoğunluğuna bağlı olarak oluşabilecek ozmolaritelerde etkinlik gösterebileceği sonuçları çıkarılabilir.

Gelecekte etkili kriyoprotektif maddelerle teke spermasının dondurulmasında önemli başarıların sağlanacağı ve bu durumun direkt olarak sun'i tohumlama uygulamalarına yansıtacağı açıktır.

KAYNAKLAR

1. Aboagla EME, Terada T (2003) *Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing*. Biol Reprod, 69: 1245-1250.
2. Aisen EG, Alvarez HI, Venturino A, Gadre JJ (2000) *Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents*. Theriogenology, 53: 1053-1061.
3. Aisen EG, Medina VH, Venturino A (2002) *Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations*. Theriogenology, 57: 1801-1808.
4. Aisen EG, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A (2005) *Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders*. Cryobiol, 50: 239-249.
5. Alvarez JG, Storey BT (1983) *Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility*. Biol Reprod, 29: 548-555.
6. An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Sakurai T, Kasai M (2000) *Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa*. Cryobiol, 40: 237-249.
7. Anchoroguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH (1987) *Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing*. Cryobiol, 24: 324.
8. Aurich J.E., Schönherr U, Hoppe H, Aurich C (1997) *Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen*. Theriogenology, 48: 185-192.
9. Ball BA, Medina V, Gravance CG, Bumber J (2001) *Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C*. Theriogenology, 56: 577-589.
10. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C (2000) *Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing*. Mol Reprod Dev, 55: 282-288.
11. Bilodeau, JF, Blanchette LS, Gagnon IC, Sirard MA (2001) *Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen*. Theriogenology, 56: 275-286.
12. Bucak, MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A (2007) *The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process*. Theriogenology, 67: 1060-1067.
13. Bucak MN, Tekin N (2007) *Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen*. Small Rum Res, 73: 103-108.
14. Bucak MN, Uysal O (2008) *The role of antioxidants in freezing of saanen goat semen*. Indian Vet J, 73: 103-108.
15. Cabria E, Anel L, Herraez MP (2001) *Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm*. Theriogenology, 52: 623-635.
16. Chatterjee S, DE Lamirande E, Gagnon C (2001) *Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione*. Mol Reprod Dev, 60: 498-506.
17. Chen Y, Foote RH, Brockett CC (1993) *Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm*. Cryobiol, 30: 423-431.
18. Curry MR, Watson PF (1994) *Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury*. Cryobiol, 31: 39-46.
19. Daşkiran İ (2006) *Ankara keçisi*. Erişim: [http://irfandaskiran.8m.com/angora.html]. Erişim tarihi: 10.11.2006.
20. Foote RH, Chen Y, Brockett CC (1993) *Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, or blood serum*. J Dairy Science, 76: 1908-1913.
21. Funahashia H, Sano T (2005) *Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C*. Theriogenology, 63: 1605-1616.
22. Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S (2004) *Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders*. Theriogenology, 62: 690-701.

23. Gao DY, Crister JK (2000) *Mechanisms of cryoinjury in living cells*. *Ilar Journal* (Online), 41: 4.
24. Griveau, JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le LD (1995) *Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa*. *J Reprod Fertil*, 103: 17-26.
25. Holt WT (2000) *Basic aspects of frozen storage of semen*. *Anim Reprod Sci*, 62: 3-22.
26. Jeulin C, Soufir JC, Laval-Martim D, Calvayrac R (1989) *Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma*. *Gamete Res*, 24: 185-196.
27. 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.
28. Khalifa, TAA, EL-Saidy BE (2006) *Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender*. *Anim Reprod Sci*, 93: 303-315.
29. Kuo YL, Tzeng WL, Chiang HK, Ni RF, Lee TC, Young ST (1998) *New system for long-term monitoring of sperm motility: EDTA effect on semen*. *Arch Androl*, 41: 127-133.
30. Maxwell WMC, Watson PF (1996) *Recent progress in the preservation of ram semen*. *Anim Reprod Sci*, 42: 55-65.
31. McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP (1995) *Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono-and disacc-harides*. *Hum Reprod*, 10: 1163-1171.
32. Namdar O (2006) *Ankara keçisi*. Erişim: [<http://www.ankaratarim.gov.tr/diger/keci/akecisi.htm>]. Erişim tarihi: 22.11.2006.
33. Neild D, Chavez M, Plores N., Mora M, Beconi M, Aguero A (1999) *Hypoosmotic test in equine spermatozoa*. *Theriogenology*, 51: 721-727.
34. Nicollajsen H, Hvidt A (1994) *Phase behaviour of the system trehalose- NaCl-water*. *Cryobiol*, 31: 199-205.
35. Nissen HP, Kreysel HW (1983) *Superoxide dismutase in human semen*. *Klinische Wochenschrift*, 61: 63-65.
36. Perez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, Garcia-Casado PA (2001) *Short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility*. *Theriogenology*, 56: 387-398.
37. Purdy PH (2006) *A review on goat sperm cryopreservation*. *Small Rum. Res*, 63: 215- 225.
38. Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid, H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen, DH, Shigoyuki A, Kurimoto M (2002) *Trehalose: a review of prpoperties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies*. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 871-898.
39. Riffo, M, Leiva S, Astudillo J (1992) *Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction*. *Int J Androl*, 15: 229-237.
40. Shan X, Aw T, Jones D (1990) *Glutathione-dependent protection against oxidative injury*. *Pharmac. Ther.*, 47: 61-71.
41. Sinha MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL (1996) *The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen*. *Anim Reprod Sci*, 41: 237-243.
42. Slaweta R, Laskowska T (1987) *The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen bull semen*. *Anim Reprod Sci*, 13: 249-253.
43. Sørensen MB, Stoltenberg M, Danscher G, Ernst E (1999) *Chelation of intracellular zinc ions affects human sperm cell motility*. *Mol Hum Reprod*, 5: 338-341.
44. Watson PF (1995) *Recent developments and concepts in the cryopreservation of sperma-tozoa and the assessment of their post-thawing function*. *Reprod Fertil Dev*, 7: 871-891.
45. Watson PF (2000) *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. *Anim Reprod Sci*, 60: 481-492.
46. Woelders H, Matthij 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*. *Cryobiol*, 35: 93-105.