



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2017; 31 (2): 73 - 79
http://www.fusabil.org

Şeyma ÖZER KAYA
Seyfettin GÜR

Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni
Tohumlama Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Koç Spermasının Kısa Süreli Saklanabilirliği Üzerine L-Arjinin İlavesinin Etkisi^{*,**}

Bu çalışma koç spermasına L-arjinin ilavesinin kısa süreli saklamaya etkisini araştırmak amacıyla yapıldı. Altı koçtan 5 hafta boyunca haftada bir kez suni vajenle alınan ejakulatlar birleştirildi. Sperma örnekleri mililitrede 400 milyon motil sperm olacak şekilde Tris-yumurta sarısı sulandırıcısıyla sulandırıldıktan sonra 6 eşit kısma ayrıldı. Örneklerden biri kontrol amacıyla tutulurken, diğerlerine sırasıyla 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM L-arjinin ilave edildi. Örnekler kısa süreli saklama için soğutma kabininde +4 °C'de bekletildi. 0., 12., 24. saatlerde ve daha sonra da 24 saat aralıklarla motilite, membran bütünlüğü, arginaz aktivite analizleri yapıldı. Kısa süreli saklanan örnekler değerlendirildiğinde, 10 mM L-arjinin ilavesinin sperma örneklerinin motilitesini 12. saatten sonra, membran bütünlüğünü 48. saatten sonra (P<0.05), arginaz aktivitesini ise 24., 72., 96. saatlerde azalttığı (P<0.01) gözlemlendi. Sonuçta sulandırıcıya katılan L-arjinin'in 10 mM dozunun kısa süreli saklama esnasında spermanın kalitesine zarar verdiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: L-arjinin, arginaz, saklanabilirlik, sperma, koç

Effect of L-Arginine Addition on Short Term Storability of Ram Semen

This study was conducted to investigate the effect of L-arginine addition on short term storability of ram semen. The semen collected from 6 Akkaraman rams by using artificial vagina once a weeks during 5 weeks, was pooled. The semen samples were diluted with Tris-egg yolk extender to include 400 million motile sperms per mL and were then divided into 6 equal groups. While group 1 was kept as control, 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM L-arginine were added to the other groups. The groups were kept at +4 °C for short term storage. Motility, membrane integrity, arginase activity were analyzed at 0, 12th, 24th h and then at 24 h intervals. When the samples stored in short term at +4 °C were evaluated, it was observed that the addition of 10mM L-arginine to semen samples decreased the motility after the 12nd h and membrane integrity after the 48th h (P<0.05), but the addition of 10 mM L-arginine decreased the arginase activity at the 24th, 72th, 96th (P<0.01). In conclusion, 10 mM dose of L-arginine added to the diluent damaged to the quality of the semen during short-term storage.

Key Words: L-arginine, arginase, storability, semen, ram

Giriş

Koyun yetiştiriciliğinde fazla sayıda hayvanın kısa süre içerisinde tohumlanabilmesi için kullanılacak spermanın elde hazır bulunması gerekmektedir. Dondurulmuş ve çözdürülmüş koç spermasıyla yapılan servikal tohumlamalarda fertilité oranının düşük olması, araştırmaları spermanın kısa süreli saklanması üzerinde yoğunlaştırmıştır (1).

Spermanın saklanmasıdaki temel yaklaşım spermlerin metabolizmasını yavaşlatmak ve enerji kullarımlarını azaltarak yaşam sürelerini uzatmaktır. Yapılan araştırmalar sonucunda spermanın saklanması için iki yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan birincisi, spermanın sıcaklığını düşürmek vasıtasıyla spermlerin metabolizmasını yavaşlatarak sıvı şekilde kısa süreli, ikincisi ise 0 °C'den daha düşük sıcaklıklarda spermanın dondurularak uzun süreli saklanmasıdır (2).

Spermanın işlenmesi sırasında şekillenen membran hasarları soğutma sıcaklığının özellikle 20 °C den 5 °C'e hızlı düşmesi sonucu soğuk şoku ve depolama sırasında spermlerin yaşlanmasına bağlı olarak meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır (3). Spermanın soğutulması sırasında ısının düşmesine bağlı olarak faz geçişi esnasında spermlerin plazma membranlarında yer alan lipitler, fiziksel bir değişikliğe uğrayarak yumuşak ve akışkan durumlarını yitirip, daha sert ve daha az akışkan bir hale gelirler (4). Soğutma sırasında sperm membranlarında ortaya çıkan hasarların bu faz geçişi sonrasında lipitlerin yeniden başlangıçtaki biçimde

Geliş Tarihi : 20.02.2017
Kabul Tarihi : 07.04.2017

Yazışma Adresi Correspondence

Seyfettin GÜR
Fırat Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi,
Dölerme ve Suni
Tohumlama Anabilim Dalı
Anabilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

sgur1@firat.edu.tr

* Bu çalışma Şeyma ÖZER KAYA'nın doktora tezinden özetlenmiş ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP, VF.14.10) tarafından desteklenmiştir.

** 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, 29 Eylül-5 Ekim 2013, Manavgat / Antalya.

düzenlenememesi veya normal dağılımlarını kazanamamaları neticesi olduğu ifade edilmektedir (5).

Koç sperminin plazma membranı doymamış yağ asitince zengin olduğundan lipid peroksidasyonuna karşı son derece duyarlıdır. Spermanın kısa süreli saklanması sırasında hücreler lipid peroksidasyona maruz kalabilmekte ve bunun sonucu olarak da sperm motilitesinde, membran bütünlüğünde kayıplar, fertilité oranlarında düşmeler yaşanmaktadır (2). Bu olumsuz etkiler, spermanın saklanması öncesi sulandırıcılara bazı kimyasalların ilavesiyle dengelenmeye çalışılmaktadır (6).

Vücutta uygun bir protein sentezi elde edebilmek için, bütün aminoasitlerin mutlaka aynı zamanda ve doğru miktarlarda bulunmaları gereklidir. Bir aminoasit olan arjinin D ve L olarak iki formdan oluşur. Eğer bir aminoasit kullanılıyorsa, vücut için en uygun olan L-formlarının kullanılması gerekmektedir (7).

Vücutta doğal olarak bulunan aminoasitlerden biri olan L-arjinin (L-A) (2 amino 5 guadinovalerik asit) farklı kimyasal yollarla sentezlenir. Bunlar sitrülinden L-A sentezi (ince bağırsak, böbrek ve karaciğerde), glutamattan L-A sentezi ve proteinlerin yıkımından L-A oluşumu şeklindedir (8).

L-A, hayvan hücrelerinde çeşitli dokularda farklı metabolik olaylara katılıp önemli bileşiklerin yapılarında yer almaktadır (9). Vücutta L-A, arginaz enzimi ile ornitin ve üreye katabolize olur. L-A'dan sentezlenen ornitin, poliamin sentezi için bir prokürsördür. Poliamin biyosentezinde arginaz başlangıç enzimi olup oluşan ornitin, ornitin dekarboksilaz enzimi ile putresin'e dönüşmekte, putresin de daha sonra spermin ve spermidin sentezine katılmaktadır (10).

Koç spermasının seminal plazmasında ve başta epididimis olmak üzere erkek üreme sisteminin diğer kısımlarında çeşitli poliaminler (putresin, spermin, spermidin) bulunur. Poliaminler bir hücrenin büyümesi ve farklılaşması için önemli olan biyomoleküllerdir. L-A de poliaminleri etkileyerek sperm motilitesinde artışa neden olmaktadır (11).

L-A'in bir başka önemli rolünde, nitrik oksit (NO) sentezinde bir prekürsör olmasından kaynaklanmaktadır. NO için klasik bir reseptör bölgesi yoktur. NO, nonadrenerjik-nonkolinerjik nörotransmisyon süresince endotelden salınır ve böylece kaslarda guanilil siklazı aktive edip, onun HEM grubuna bağlanarak hücre için ikinci haberci molekül olarak çalışan siklik guanozin monofosfat (sGMP)'in birikmesine yol açar. sGMP, miyozin hafif zincir kinazın defosforilasyonuna neden olur. sGMP seviyelerini artırıp vasküler düz kasta kalsiyum seviyelerini azaltarak düz kasların (korpus kavernozum) gevşemesini sağlar ve buna bağlı olarak ereksiyonda önemli bir rol üstlenir (12, 13).

Bir reaktif oksijen türü olan NO çeşitli fizyolojik sistemlerde bulunur ve erkek üreme sisteminin farklı organlarını düzenlemede önemli bir rol oynar. NO oksijen

ve farklı kofaktörleri (adenin dinükleotid fosfat, flavin mononükleotid, flavin adenin dinükleotid) kullanarak NOS enzimi tarafından L-A den türer. Böyle enzimler kapasite olmayan spermin kuyruk ve akrosomu üzerinde bulunur (14).

Bunlara ilaveten L-A'in antioksidan özelliği de vardır. Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit anyonlarını (O₂⁻) etkili bir şekilde süpürmektedir (15).

Spermadaki endojen antioksidatif kapasite spermanın kısa süreli saklanmasında yeterli gelmemektedir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) zarar verici etkisine karşı sperm ve seminal plazma antioksidatif savunma sistemlerine sahiptir. Ancak, sperm hücrelerinin küçük sitoplazmasına bağlı olarak antioksidatif savunma sistemleri kısıtlıdır. Seminal plazmada doğal olarak bulunan veya bulunmayan taurin, hypotaurin, inositol, prolin, süperoksit dismutaz, katalaz, piruvat, glutatyon, ergotiyonin, trehaloz, askorbik asit, alfa-tokoferol gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir. Bu amaçla çeşitli antioksidanlar sperma sulandırıcılarına katılmıştır (6, 16, 17).

L-A spermatogenezisin devam ettirilmesinde gerekli olup, nükleoproteinlerin yapısına girdiği ve spermelerde önemli bir nükleoprotein komponenti oluşturduğu bildirilmiştir. Spermatogenezisin hem mitoz hem de mayoz bölünmesi sırasında çok miktarda nükleoproteine ihtiyacı vardır. Sperm nükleoproteini ise L-A bakımından çok zengindir. L-A'dan yetersiz beslenmenin, emilimindeki bozukluğun ve anormal aktivitesinin, dokulardaki metabolizmanın düzensizliğine, dolayısıyla mitozun bozulmasına neden olduğu belirtilmiştir. L-A spermde laktat jenerasyonunu ve adenosin trifosfatın oranını artırır ve sonuçta glikolizis oranını yükseltir. Böylece L-A'in, adenosin trifosfat sentezinden dolayı sperm motilitesini arttırdığı bilinmektedir (18-20). L-A eksikliği ise spermatogeneziste bozukluklara ve motilitenin azalmasına neden olur. Bu durumla L-A eksikliği arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür (21).

Bu çalışma, koçlarda sulandırıcı solusyonuna L-A ilavesinin spermanın kısa süreli saklanmasına etkisinin olup olmadığını incelemek amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırmada hayvan materyali olarak 2-3 yaşlarında, klinik olarak sağlıklı, fertilitesi bilinen ve genital organ muayenelerinde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmayan 6 Akkaraman koç kullanıldı.

Çalışmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı alındı (2013/10). Sperma alma çalışmaları üreme sezonu içerisindeki ayları arasında gerçekleştirildi.

Araştırmada kullanılan koçlar çalışma öncesince hormonal uyarımlarla kızgınlığa getirilen koyun eşliğinde suni vagene alıştırıldı. Her bir koçtan alınan ejakulat örnekleri birleştirilerek çalışıldı.

Spermanın Kısa Süreli (+4 °C) Saklanması: Altı koçtan 5 hafta süreyle haftada bir kez sperma örnekleri alındı. Haftalık olarak alınan ejakülatlar 37 °C'de pooling yapıp mililitrede 400 milyon motil sperm olacak şekilde Tris-Yumurta sarısı (Tris 3.63 g, sitrik asit 1.99 g, glukoz 0.5 g, 100 mL için) sulandırıcısıyla sulandırıldı ve 6 eşit kısma ayrıldı. Kısımlardan biri kontrol olarak tutulurken, diğer kısımlar sırasıyla 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM ve 10 mM L-A ilave edildi.

L-A ilavesinden sonra sulandırılmış sperma örneklerinin sıcaklığı özel soğutma kabiniinde +4 °C'ye indirildi. Bu sıcaklıkta tutulan sperma örneklerinde 0, 12, 24. saatlerde ve daha sonra da 24 saat aralıklarla 120. saate kadar motilite, membran bütünlüğü ve arginaz aktivitesi analizleri yapıldı.

Sperm Motilitesi ve Hipoozmotik Swelling (HOS)

Test: Sperm motilitesini belirlerken öncelikle sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış mikroskobun ısıtma tablasında lam üzerine 0.5 mL tris sulandırıcısı ve üzerine 3 µL sperma konularak sulandırıldı. Üzerine lamel kapatılarak Faz-kontrast mikroskop altında 400'lük büyütmede motilite 3 farklı sahada yüzde olarak belirlendi (22).

Sperm plazma membran bütünlüğünün belirlenmesi için HOS testi kullanıldı. Şişmiş ve kıvrılmış kuyruğa sahip sağlam spermelerin oranı yüzde olarak ifade edildi (23).

Arginaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi:

Sperma örnekleri 15.000 g'de 13 dakika soğutmalı santrifüjle +4 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen seminal plazmalar, arginaz aktivitesi tayin edilinceye kadar -20 °C'de saklandı. Seminal plazma arginaz aktivitesi Gayer ve Dabich (24)'in bildirdiği thiosemicarbazide-diacetylmonoxime-urea (TDMU) metodunun bir modifikasyonu ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Protein yoğunluğu ise Lowry ve ark. (25)'nin bildirdiği metotla tespit edildi. Sonuçlar daha sonra U/mg protein olarak verildi.

İstatistiksel Analiz: Çalışmada elde edilen veriler ortalama ve standart hata (±SEM) değerleri olarak sunuldu. Verilerin istatistiki karşılaştırmaları için SPSS (22.0, Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanıldı. P<0.05 değeri istatistiki açıdan önemli kabul edildi.

Verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerini tespit etmek için Shapiro-Wilk normallik analizi yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendikten sonra kontrol ve L-A ilave edilen gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey-HSD testi ile karşılaştırıldı. Aynı grup içerisinde zamana bağlı farklılıkların tesbitinde, tekrarlı ölçümler için tek

yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ikili karşılaştırmalarda ise bağımlı t testi uygulandı.

Bulgular

Soğutma kabiniinde +4 °C'de kontrol ve farklı doz L-A katılan sulandırılmış sperma örneklerinin zamana göre ortalama (±SEM) motilite değerleri Tablo 1'de görülmektedir. L-A'in 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM ve 5 mM'lik dozlarının tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında motilite üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ancak 10 mM L-A ilavesi 24. saatten itibaren kontrol grubuna göre motiliteyi önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir (P<0.05). Tüm gruplarda grup içi zamana göre motilitede belirli bir azalma tespit edilmiştir. Kontrol, L-A'in 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM ve 5 mM grupları kendi içerisinde zamana göre karşılaştırıldığında, 48. saatten itibaren önemli azalmalar gözlenmiştir (P<0.05). Ancak L-A 10 mM grubunda motilitede 12. saatten itibaren azalmalar belirlendi (P<0.01).

Soğutma kabiniinde +4 °C'de kontrol ve L-A ilave edilen sperma örneklerinin zamana göre ortalama (±SEM) HOS test değerleri Tablo 2'de verildi.

Spermaya 10 mM L-A ilavesinin 72. saatten itibaren hem kontrol hem de diğer L-A gruplarına göre HOS değerlerini önemli düzeyde azalttığı (P<0.05) belirlendi. Kontrol grubunda 0., 12., 24., 48. saatler ile 72., 96., 120. saatlerdeki HOS testi değerleri arasında fark önemli bulundu (P<0.01). L-A 0.1 ve 0.5 mM gruplarında 0., 12., 24., 48. ve 72. saatlerdeki HOS testi değerleri ile hem 96. hem de 120. saatler arasında ve 96. saat ile de 120. saatler arasındaki farklılıklar önemliydi (P<0.05). L-A 1 mM grubunda 0., 12., 24. saatler ile 48., 72., 96., 120. saatlerdeki, 48. ile 72., 96., 120. saatlerdeki ve 72. ile 120. saatlerdeki HOS testi değerleri arasındaki farklılıklar önemli bulundu (P<0.05). L-A 5 mM grubunda 0. ile 48., 72., 96., 120. saatlerdeki, 12., 24. ile 72., 96., 120. saatlerdeki ve 48. ile 120. saatlerdeki HOS testi değerleri arasında farklılıklar önemli bulundu (P<0.05). 10 mM L-A ilave edilen grupta 0., 12., 24., 48. saatleri ile 72., 96., 120. saatler arasındaki fark önemli bulunmuştur (P<0.05).

Çalışmada kontrol ve farklı doz L-A ilave edilen sperma örneklerinin zamana göre ortalama (±SEM) arginaz enzim aktivite değerleri Tablo 3'te verildi. L-A 0.5 mM grubu 24. saatte 10 mM grubuna göre, 96. saatte ise hem 5 mM hem de 10 mM grubuna göre arginaz aktivitesinde önemli artışa neden olmuştur (P<0.05). Ancak 10 mM L-A ilave edilen grubun 72. saatteki arginaz aktivitesinde kontrol grubuna göre azalma görülmüştür (P<0.05).

Tablo 1. Koçlarda sulandırıcı solusyonuna L-Arjinin ilave edilen ve kontrol grubu spermalarının +4 °C'de zamana bağlı ortalama (\pm SEM) motilite değerleri

Gruplar	Zaman (saat)							P değeri
	0.	12.	24.	48.	72.	96.	120.	
Kontrol	90.0 \pm 0.0 ^a	90.0 \pm 0.0 ^{Aa}	90.0 \pm 0.0 ^{Aa}	72.0 \pm 4.9 ^{ABb}	58.0 \pm 5.8 ^c	34.0 \pm 5.1 ^d	10.0 \pm 3.2 ^{Ae}	0.001
L-A 0.1mM	90.0 \pm 0.0 ^a	90.0 \pm 0.0 ^{Aa}	90.0 \pm 0.0 ^{Aa}	82.0 \pm 2.0 ^{Ab}	56.0 \pm 4.0 ^c	32.0 \pm 5.8 ^d	10.0 \pm 3.2 ^{Ae}	0.004
L-A 0.5 mM	90.0 \pm 0.0 ^a	90.0 \pm 0.0 ^{Aa}	90.0 \pm 0.0 ^{Aa}	80.0 \pm 5.5 ^{Ab}	52.0 \pm 6.6 ^c	28.0 \pm 5.8 ^d	10.0 \pm 3.2 ^{Ae}	0.003
L-A 1 mM	90.0 \pm 0.0 ^a	90.0 \pm 0.0 ^{Aa}	90.0 \pm 0.0 ^{Aa}	78.0 \pm 3.7 ^{Ab}	50.0 \pm 10.5 ^c	24.0 \pm 6.0 ^d	8.0 \pm 3.7 ^{ABe}	0.005
L-A 5 mM	90.0 \pm 0.0 ^a	90.0 \pm 0.0 ^{Aa}	90.0 \pm 0.0 ^{Aa}	74.0 \pm 2.5 ^{ABb}	52.0 \pm 8.0 ^c	18.0 \pm 3.7 ^d	4.0 \pm 2.4 ^{ABe}	0.006
L-A 10 mM	88.0 \pm 2.0 ^a	86.0 \pm 2.4 ^{Bab}	78.0 \pm 2.0 ^{Bb}	64.0 \pm 2.5 ^{Bc}	40.0 \pm 3.2 ^d	20.0 \pm 5.5 ^e	0.0 \pm 0.0 ^{Bi}	0.000
P değeri	0.439	0.047	0.030	0.028	0.527	0.248	0.05	

^{A, B}: Her bir zaman diliminde gruplar arasındaki önemli farklılığı göstermektedir.

^{a, b, c, d, e, f}: Herbir grupta zaman dilimleri arasındaki önemli farklılığı göstermektedir.

Tablo 2. Koçlarda sulandırıcı solusyonuna L-Arjinin ilave edilen ve kontrol grubu spermalarının +4 °C'de zamana bağlı ortalama (\pm SEM) HOS testi değerleri

Gruplar	Zaman (saat)							P değeri
	0.	12.	24.	48.	72.	96.	120.	
Kontrol	78.4 \pm 3.1 ^a	77.8 \pm 3.1 ^a	79.2 \pm 3.8 ^a	74.0 \pm 3.9 ^a	66.2 \pm 3.4 ^{Bbcd}	58.0 \pm 4.2 ^{Bcd}	52.0 \pm 2.9 ^{Bd}	0.022
L-A 0.1 mM	80.8 \pm 3.2 ^a	75.0 \pm 2.4 ^a	78.6 \pm 3.1 ^a	72.6 \pm 1.7 ^a	68.6 \pm 2.6 ^{Ba}	62.2 \pm 2.3 ^{Bb}	52.6 \pm 1.1 ^{Bc}	0.028
L-A 0.5 mM	79.4 \pm 4.3 ^a	72.0 \pm 2.8 ^a	76.4 \pm 4.5 ^a	71.8 \pm 3.0 ^a	68.4 \pm 0.7 ^{Ba}	62.6 \pm 1.1 ^{Bb}	53.4 \pm 1.2 ^{Bc}	0.049
L-A 1 mM	78.2 \pm 4.0 ^a	74.8 \pm 2.3 ^a	77.4 \pm 3.4 ^a	71.2 \pm 2.4 ^b	65.4 \pm 1.5 ^{Bc}	60.0 \pm 2.5 ^{Bcd}	52.2 \pm 0.9 ^{Bd}	0.043
L-A 5 mM	79.2 \pm 3.6 ^a	76.0 \pm 2.7 ^{ab}	75.4 \pm 3.1 ^{ab}	71.0 \pm 3.3 ^{bc}	68.4 \pm 1.3 ^{Bc}	62.4 \pm 2.2 ^{Bcd}	56.8 \pm 1.2 ^{Bd}	0.014
L-A 10 mM	77.2 \pm 1.6 ^a	75.4 \pm 2.2 ^a	73.8 \pm 2.8 ^a	73.8 \pm 2.9 ^a	52.4 \pm 2.6 ^{ABcd}	50.4 \pm 3.5 ^{Accd}	46.6 \pm 3.1 ^{Ad}	0.040
P değeri	0.954	0.860	0.885	0.963	0.090	0.023	0.011	

^{A, B}: Gruplar arası farklılığı göstermektedir.

^{a, b, c, d}: Herbir grupta zaman dilimleri arasındaki önemli farklılığı göstermektedir.

Tablo 3. Koçlarda sulandırıcı solusyonuna L-Arjinin ilave edilen ve kontrol grubu spermalarının +4 °C'de zamana bağlı ortalama (\pm SEM) seminal plazma arginaz enzim aktivite değerleri

Gruplar	Zaman (saat)							P değeri
	0.	12.	24.	48.	72.	96.	120.	
Kontrol	0.30 \pm 0.05	0.29 \pm 0.06	0.32 \pm 0.04 ^{AB}	0.34 \pm 0.04	0.40 \pm 0.08 ^B	0.31 \pm 0.03 ^{AB}	0.15 \pm 0.04	0.601
L-A 0.1mM	0.28 \pm 0.03	0.26 \pm 0.02	0.27 \pm 0.03 ^{AB}	0.40 \pm 0.05	0.37 \pm 0.06 ^{AB}	0.28 \pm 0.05 ^{AB}	0.15 \pm 0.02	0.156
L-A 0.5 mM	0.29 \pm 0.03	0.27 \pm 0.04	0.44 \pm 0.03 ^B	0.40 \pm 0.05	0.37 \pm 0.05 ^{AB}	0.42 \pm 0.06 ^B	0.14 \pm 0.02	0.526
L-A 1 mM	0.32 \pm 0.04	0.32 \pm 0.04	0.39 \pm 0.05 ^{AB}	0.33 \pm 0.06	0.29 \pm 0.03 ^{AB}	0.34 \pm 0.05 ^{AB}	0.18 \pm 0.05	0.748
L-A 5 mM	0.39 \pm 0.09	0.33 \pm 0.03	0.35 \pm 0.05 ^{AB}	0.34 \pm 0.05	0.31 \pm 0.05 ^{AB}	0.23 \pm 0.05 ^A	0.12 \pm 0.01	0.871
L-A 10 mM	0.35 \pm 0.03	0.35 \pm 0.03	0.26 \pm 0.03 ^A	0.32 \pm 0.04	0.21 \pm 0.02 ^A	0.20 \pm 0.03 ^A	0.08 \pm 0.01	0.576
P değeri	0.666	0.558	0.06	0.832	0.046	0.035	0.392	

^{A, B}: Herbir zaman diliminde gruplar arasındaki önemli farklılığı göstermektedir.

Tartışma

Arginaz enziminin koç üreme sisteminin tüm kısımlarında farklı seviyelerde olduğu ve üretranın mukozal katlarında >60 IU/mg protein, seminal sıvı ve bulboüretal bezde ise en az 9–10 ile 20–31 IU/mg protein arginaz aktivitesinin olduğu bildirilmektedir (26). Memelilerde prostat, testis ve seminal plazmada, boğa (27) ve koçlarda ise (28) üreme sisteminin diğer kısımlarında ve epididimal spermelerde arginaz enzimi bulunmaktadır. L-A teke spermının fizyolojisinde ve hücre metabolizmasının arttırılmasında önemli bir rol oynadığı, ayrıca L-A'in ve alfa-tokoferol'un lipit peroksidasyona karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirilmektedir (29). Bir aminoasit olan L-A'in lipit peroksidasyonu önlediği ve antioksidan savunma mekanizmasını desteklediği bu etkisini de NO aracılığıyla ve ROS'un azaltılmasıyla ortaya koyduğu bildirilmektedir (30).

Antioksidanların düşük dozlarda kullanılmalarında oluşacak sperm üzerindeki koruyucu etkinliği, yüksek dozda kullanıldıklarında (31), sperm metabolizması için gerekli olan serbest radikal oluşumunu engelleyebileceğini düşündürerek, olası antioksidatif etkilerini durduracağı ve toksik etkilere neden olacağı kanısını doğurmaktadır (32).

Farklı konsantrasyonlarda L-A ilave edilerek inkübasyona bırakılan koç sperma örneklerinde bıraktıklarında L-A'in düşük konsantrasyonlarının sperm motilitesini az etkilediği, yüksek konsantrasyonlarının ise motiliteyi önemli derecede azalttığı belirtilmektedir (33). O'Flaherty ve ark. (34) L-A farklı dozlarını boğa spermına katarak inkübasyona bıraktıklarını ve kontrolle kıyasladıklarında 10 mM ve aşağı dozlarının motiliteye herhangi bir etkisinin olmadığı, ancak 10 mM'dan yüksek dozlarının sperm motilitesini azalttığını bildirmektedirler. NO, oksijen ve farklı kofaktörleri (adenin dinükleotid fosfat, flavin mononükleotid, flavin adenin dinükleotid) kullanarak NOS enzimi tarafından L-A'den türer. L-A'in yüksek konsantrasyonları muhtemelen NO'in aşırı üretimi dolayısıyla sperm toksisitesine neden olur. Peroksidasyon sonucunda toksik peroksidasyon anyonlarının peroksinitritlere dönüşümleri, sperm motilitesinde azalmaya neden olmaktadır (14).

Ratnasooriya ve Dharmasiri (35) spermaya farklı dozlarda katılan L-A'in motilite üzerine etkisini inceledikleri çalışmada doz yükseldikçe motilitenin düştüğünü belirtmişlerdir. Morales ve ark. (36) astenospemili hastalardan elde edilen 10 sperma örneğine L-A ilave edildiğinde sperm motilitesinin arttığı belirlenmiştir. Carvalho ve ark. (37) farklı dozlarda 0, 2, 5, 10, 20 mM L-A ilave edilerek farklı sürelerde inkübasyona bıraktıkları aygır spermalarında 20 mM L-A ilave edilen grupta motiliteyi en düşük bulduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada farklı oranlarda L-A (0.1, 0.5, 1, 5, 10 mM) ilave edildikten sonra +4 °C'de tutulan sperma örneklerinde 10 mM ilave edilen grubun sperm motilitesini 12. saatten itibaren kontrol ve diğer L-A dozlarının ilave edildiği gruplara göre önemli derecede düşürdüğü, diğer dozlarının olumlu ya da olumsuz etkileri

gözlenmemiştir. L-A 10 mM grubunda sperm motilitesinin 12. saatten sonra önemli derecede düşüş göstermesi bu oranın fizyolojik sınırların üstünde olması ve toksik etki yapmasından kaynaklanmış olabilir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular Morales ve ark. (36)'nın tespit ettikleri sonuçlar dışında, diğer araştırmacının (33, 34) sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Morales ve ark. (36)'nın bulguları ile mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar arasındaki çelişki, çalışmalarda kullanılan türlerin farklılığına ve sulandırıcının etkisine bağlı olabilir.

Bazı çalışmalarda spermaya karnitin, glutamin (38) albümin ve sistein (39) gibi aminoasitler katılarak kriyoprezervasyonu esnasında spermde meydana gelen motilite kayıpları ve membran bozuklukları önlenmeye çalışılmış ve bu maddelerin koruyucu etkilerinin olduğu öne sürülmüştür. Yapılan çalışmada farklı oranlarda L-A ilave edilen +4 °C'de tutulan sperma örneklerinde, sperm membran bütünlüklerinde meydana gelen kayıp L-A 10 mM grubunda kontrol ve diğer gruplara göre 72. saatte önemli bulunmuştur. Buna karşın L-A'in diğer oranlarında sperm membran bütünlüğü üzerine olumlu ya da olumsuz etkisi gözlenmemiştir. L-A'in farklı oranlarının kısa süreli saklanan spermaların membran bütünlüğü üzerine etkileri ile ilgili bir başka çalışmaya rastlanmamıştır. 10 mM L-A katılan grupta 48. saatten sonra membran bütünlüğünde gözlenen bu olumsuz etki, bu dozun spermeler üzerindeki toksisitesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Arginaz aktivitesinin koç üreme sisteminin tüm kısımlarında farklı seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Epididimal spermelerde (28) testis dokusunda (40), seminal sıvı ve bulboüretal bezde arginaz enziminin belli seviyelerde olduğu belirtilmiştir (26). Gür ve ark. (41) koç seminal plazmasında arginaz aktivitesini 0.61 U/mg protein, Türk ve ark. (42), teke seminal plazmasında arginaz aktivitesini 0.9 U/mg protein olarak bulduklarını, her iki çalışmada da arginaz aktivitesiyle sperm motilitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada spermaya 10 mM L-A eklenen grubun seminal plazma arginaz aktivitesi kontrol ve diğer gruplara göre 0 ve 12. saat hariç genel anlamda daha düşük tespit edilmesine rağmen sadece 72. saatteki değer, kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Arginaz enzimi ile sperm motilitesi arasında pozitif bir ilişki olduğunun belirtildiği çalışmalar (41, 42) ile mevcut çalışmada L-A 10 mM grubunda elde edilen bulgular arasında benzerlik görülmüştür. Çünkü bu çalışmada kısa süreli saklama boyunca 10 mM L-A eklenen grubun sperm motilitesi ve seminal plazma arginaz aktivitesi düşmüştür. L-A ilave edilerek kısa süreli saklama sonucu arginaz aktivitesini belirleyen bir başka çalışmaya rastlanmamasına rağmen, bu çalışmada 10 mM L-A ilavesinde meydana gelen düşüş, spermaya katılan L-A'in yüksek oranda olması ve arginazın da bu yüksek miktarla reaksiyona girmesi için çok fazla tüketilmesine bağlı olabilir.

Sonuç olarak, spermaya 10 mM L-A ilavesinin kısa süreli saklama esnasında sperma kalitesine zarar verdiği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 55-65.
2. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 77-111.
3. Paulenz H, Söderquist L, Perez-Pe R, Berg KA. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 2002; 57: 823-836.
4. White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reproduction Fertility Development* 1993; 5: 639-658.
5. Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS. Composition and behavior of head membrane-lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 1994; 31: 224-238.
6. Bucak MN, Tekin N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research* 2007; 73: 103-108.
7. Gökçek İ. "L-Arginin aminoasidi". <https://www.bitkisel Tedavi.net/forum/baslik/l-arginin-aminoasidi/> 26.02.2016.
8. Soeters PB, Hallemeesch MM, Bruins MJ. Quantitative in vivo assessment of arginine utilization and nitric oxide production in endotoxemia. *Am J Surgery* 2002; 183: 480-488.
9. Barış N, Turgan N, Ersöz B. Argininin tıpsal biyokimyadaki önemi. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2004; 2: 83-90.
10. Pegg AE, Mccann P. Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans. *ISI Atlas of Sci Biochem* 1988; 11-18.
11. Melendrez CS, Ruttle JL, Halford DM, Chaudhry PS, Casillas ER. Polyamines in ejaculated ram spermatozoa and their relationship with sperm motility. *J Androl* 1992; 13: 293-296.
12. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev* 1991; 43: 109-141.
13. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10. Baskı, Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd Sti, 2002.
14. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide, *FASEB J* 1995; 9: 1319-1330.
15. Vergnani L, Hatrik S, Ricci F. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: Key role of L-arginine availability. *Circulation* 2000; 101: 1261-1266.
16. Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H, Aurich C. Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* 1997; 48: 185-192.
17. Lopez-Saaz A, Ortiz N, Gallego L, Garde JJ. Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. *Archives of Andrology* 2000; 44: 155-164.
18. Altınışık M. "Protein ve aminoasit metabolizması." <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-13/> 20.02.2016.
19. Schachter A, Goldman JA, Zuckerman Z. Treatment of oligospermia with the aminoacid arginine. *J Urology* 1973; 110: 311-313.
20. Patel AB, Srivastava S, Phadke RS, Govil G. Arginine activates glycolysis of goat epididymal spermatozoa: An NMR-study. *Biophysical Journal* 1998; 75: 1522-1528.
21. Srivastava S, Desai P, Coutinho E, Govil G. Mechanism of action of L-arginine on the vitality of spermatozoa is primarily through increased biosynthesis of nitric oxide. *Biol Reprod* 2006; 74: 954-958.
22. Hafez ESE. *Physiology of Reproduction, Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987.
23. Söderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 1997; 48: 1115-1125.
24. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem* 1971; 39: 412-417.
25. Lowry OH, Rosenbroug NJ, Farr A, Randall LJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
26. Razmi N, Jelodar GA, Nazifi S, Dehghani A. Arginase status in ram reproductive system. *J Appl Anim Res* 2004; 26: 57-59.
27. Razmi N, Jelodar GA, Nazifi S, Dehghani A. Arginase status in cattle reproductive system. *Vet Arhiv* 2005; 75: 31-38.
28. Mendez JD, Martinez I. Arginase activity in ram epididymal/ejaculated spermatozoa. *Arta* 1995; 7: 131-136.
29. Srivastava S, Desai P, Couthinho E, Govil G. Protective effect of L-arginine against lipid peroxidation in goat epididymal spermatozoa. *Physiol Chem Phys Med NMR* 2000; 32: 127-135.
30. Shan L, Wang B, Gao G, Cao W, Zhang Y. L-arginine supplementation improves antioxidant defenses through L-arginine/nitric oxide pathways in exercised rats. *J Appl Physiol* 2013; 115: 1146-1155.
31. Wilmore D. Enteral and parenteral arginine supplementation to improve medical outcomes in hospitalized patients. *J Nutr* 2004; 134: 2863-2867.
32. Bucak MN, Tekin N, Kulaksız R. Koç spermasının kısa süreli saklanılmasında antioksidanların etkisi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2007; 47: 15-21.
33. Hassanpour H, Teshfam M, Goodarzi AK, Tajik P, Mirshokraei P. In vitro effects of L-arginine on motion parameters in ram epididymal sperm. *Comparative Clinical Pathology* 2010; 19: 351-355.
34. O'Flaherty C, Rodriguez P, Srivastava S. L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 2004; 1674: 215-221.
35. Ratnasooriya WD, Dharmasiri MG. L-Arginine, the substrate of nitric oxide synthase, inhibits fertility of male rats. *Asian J Androl* 2001; 3: 97-103.
36. Morales ME, Rico G, Bravo C, et al. Progressive motility increase caused by L-arginine and polyamines in sperm from patients with idiopathic and diabetic asthenozoospermia. *Ginecol Obstet Mex* 2003; 71: 297-303.
37. Carvalho HF, Silva DF, Andrade AFC, et al. Effect of different L-arginine concentrations on motility patterns and hyperactivation in cryopreserved equine sperm. *J Equine Vet Sci* 2012; 32: 480-481.
38. Sarıözkan S, Özdamar S, Türk G, Cantürk F, Yay A. In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, plasma membrane integrity and DNA damage of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology* 2014; 68: 349-353.
39. Uysal O, Bucak MN. Effect of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen. *Acta Vet Brno* 2007; 76: 383-390.
40. Günaydın MB, Gölgeli MH, Kantar B. "Koç testis arjinazı: İzolasyon ve özelliklerinin belirlenmesi". <http://tip.baskent.edu.tr/kw/upload/600/dosyalar/cg/sempozyum/ogrsmmpzsm12/12.1.pdf> 21.01.2016.
41. Gür S, Kandemir FM. Relationships between seminal plasma arginase activity and spermatological parameters in rams. *Andrologia* 2012; 44: 86-91.
42. Türk G, Gür S, Kandemir FM, Sönmez M. Relationship between seminal plasma arginase activity and semen quality in Saanen bucks. *Small Ruminant Research* 2011; 97: 83-87.