

## Dondurulmuş boğa spermasının değişik kapasitör maddelerle *in vitro* kapasitasyonu\*

İlker SERİN<sup>1</sup>, Necmettin TEKİN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın; <sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara

**Özet:** Çalışmada, heparin (1. grup), heparin+kafein (2. grup) ve kafein+kalsiyum ionoforun (3. grup) *in vitro* spermatozoon kapasitasyonu üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla sperma 1. grupta 10, 25 ve 100 µg/ml heparin ile 5, 15 ve 60 dakikalık süreler için inkübasyona bırakılırken 2. grupta 5, 10, 15 mM kafein, 0, 5, 10, 25 µg/ml heparin ile ve 3. grupta 0, 5, 10 mM kafein, 0.1, 0.2, 0.3 µM kalsiyum ionofor ile kombine edilerek kullanıldı. Kapasitasyonun sağlanmasından sonra spermaya 100 µg/ml lizozofosfatidilkolin (LPC) ilave edilerek akrozom reaksiyonu (AR) indüklendi. Oluşan reaksiyonun ve spermatozoonların canlılıklarının belirlenebilmesi için trypan blue ve Giemsa ile ikili boyama yapıldı. Bu boyama ile spermatozoonların canlılıkları ve reaksiyona girmeleri gruplandırılarak değerlendirildi. Gruplar: 1- Canlı, reaksiyon (-); 2- Ölü, reaksiyon (-); 3- Canlı, reaksiyon (+); 4- Ölü, reaksiyon (+) olarak adlandırıldılar. Buna göre, her üç grupta elde edilen en yüksek kapasitasyona uğramış spermatozoon oranları 1. grupta (100 µg/ml heparinle 60 dakika inkübasyon) %25.466, 2. grupta (15 mM kafein+25 µg/ml heparin) %28.440 ve 3. grupta (10 mM kafein+0.3 µM kalsiyum ionofor) %29.908 olarak bulundu. İlk grupta kullanılan heparin konsantrasyonunun ve artan inkübasyon süresinin kapasite olmuş spermatozoon oranlarını artırdığı gözlemlendi. İkinci ve üçüncü gruplarda ise kullanılan kapasitör maddelerin birbirlerinin etkilerini destekledikleri ve toplam konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak kapasite olmuş spermatozoon oranlarının yükseldiği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Boğa, heparin, *in vitro* kapasitasyon, kafein, kalsiyum ionofor

### *In vitro* capacitation of frozen-thawed bull semen by different capacitating agents

**Summary:** In this study, the effects of heparin (1<sup>st</sup> group), caffeine plus heparin (2<sup>nd</sup> group) and caffeine plus calcium ionophore (3<sup>rd</sup> group) on *in vitro* capacitation of frozen-thawed bull semen were investigated. For this purpose, in the first group, three dosages of heparin (10, 25, 100 µg/ml) and three incubation time (5, 15, 60 min.) were examined. In the second group, 5, 10 and 15 mM concentrations of caffeine combined with 0, 5, 10, 25 µg/ml heparin and in the third group, 0, 5, 10 mM concentrations of caffeine combined with 0.1, 0.2, 0.3 µM calcium ionophore. After induction of capacitation by these agents, a dose of 100 mg/ml lysophosphatidylcholine (LPC) was added to medium to induce acrosome reaction for a period of 15 minutes. To determine the reaction and viability, spermatozoa were stained by dual staining method using trypan blue and Giemsa. Four categories of spermatozoa were identified and counted: 1- Intact acrosome, live; 2- Intact acrosome, dead; 3- Detached acrosome, live; 4- Detached acrosome, dead. In the first, second and third groups the highest results were 25.466% (100 µg/ml heparin, 60 min.), 28.440% (15 mM caffeine plus 25 µg/ml heparin) and 29.908% (10 mM caffeine plus 0.3 µM calcium ionophore), respectively. The mean proportions of capacitated spermatozoa increased as the heparin dosage and incubation period increased in the first group. A synergistic effect of caffeine plus heparin and caffeine plus calcium ionophore were observed in our study. The total dosages of capacitating agents increased, mean proportions of capacitated spermatozoa increased in the second and third groups.

Key words: Bull, caffeine, calcium ionophore, heparin, *in vitro* capacitation

### Giriş

Kapasitasyonun başlangıç aşamalarını spermatozoon plazma membranında absorbe edilmiş olan ve seminifer tubuller, epididimis, duktus deferens ve seminal plazmadan köken alan bazı komponentlerin uzaklaştırılması ya da yerlerinin değiştirilmesi oluşturur. Kapasitasyon olgusunun en önemli bölümü bu koruyucu tabakanın spermatozoon yüzeyinden ve özellikle akrozom

üzerinden uzaklaştırılması olmaktadır (12). Bu olay *in vivo* ortamda hücrelerin dişi genital kanalında bir süre kalmasından sonra meydana gelir (28). Kapasitasyon oviduktal istmusun alt bölgelerinde tamamlanır. İstmus bundan sonra bir rezervuar görevi yaparak kapasite olmuş spermatozoonları ovulasyondan sonra ampullaya bırakır (9). Bu olayda oviduktal epitel hücrelerinin önemli görevleri olduğu düşünülmektedir (14).

\* Bu araştırma "Dondurulmuş Boğa Spermasının Değişik Medyumlarda *In Vitro* Kapasitasyonu" başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

Dişi genital kanalında meydana gelen kapasitasyona yüksek konsantrasyonlarda bulunan glikoaminoglikanlar neden olur (18). Boğalarda seminal plazma, heparin bağlayıcı proteinler içerir. Bu proteinler kauda epididimis'den ayrılan spermatozoonlara ejakülasyon sırasında bağlanarak heparin ve heparin benzeri glikoaminoglikanlara affiniteyi artırır (3,18).

Heparinin ve diğer glikoaminoglikanların kapasitasyonu indükleme yeteneği, ejakülasyon sırasında spermatozoon yüzeyine bağlanan ve seminal plazmadan köken alan proteinlerin aktivitelerinde meydana getirdikleri değişiklikler ve bunun sonucunda plazma membranında meydana gelen modifikasyonlar sonucu ortaya çıkar (5).

Memelilerde akrozom reaksiyonu (AR), daha önceden kapasitasyon geçirmiş spermatozoonlarda görülen bir olgu olup fertilizasyon için mutlaka gerekli bir olaydır. Akrozomal şişme, vezikülasyon ve enzimlerin dışarı akması reaksiyon esnasında meydana gelen belli başlı morfolojik değişikliklerdir (27). Folliküler sıvı, kumulus hücreleri ve zona pellusida ile temas kuran spermatozoonlarda AR indüklenebilir. Folliküler sıvı içindeki ve dişi genital kanalında bulunan heparin ve kondriotin sülfat A gibi glikoaminoglikanlar bu etkiyi artırırlar (10,22). Memeli spermatozoonlarında iki tip AR gözlenir. Bunlardan birisi dış akrozomal membran ile plazma membranı arasındaki progressif vezikülasyon olaylarını kapsayan gerçek AR, diğeri ise hücrenin ölümünden sonra meydana gelen sahte ya da dejeneratif AR'dir (8). Bu iki reaksiyonun birbirinden ayırt edilmesi spermatozoon fonksiyonlarının belirlenmesinde, spermanın bulunduğu ortamın ve reaksiyonu aktive eden maddenin değerlendirilmesinde önemlidir (6).

Kapasitasyon fertilizasyon olgusunun bir ön koşulu olduğuna göre, kapasitasyon başarısının *in vitro* değerlendirilmesi spermanın fertilite yeteneğinin daha iyi değerlendirilmesi olanağını da sağlar. Yani spermanın kapasitasyonu stimüle eden maddelerle muamele edilmesi fertilite düzeyinin belirlenmesinde önemli bir kriterdir (4,31).

Spermatozoonları kapasite eden faktörler arasındaki farkın bulunması ya da kapasitasyonun başarısının ölçülmesi için iki temel yaklaşım vardır. Bunlardan birisi spermayı kapasitasyon koşullarına tabi tutuktan sonra uygun aşamalardan geçirilmiş oositle muamele etmek ve fertilizasyon sonuçlarına göre değerlendirme yapmak (2,11,15,19,25), diğeri ise reaksiyona uğramış spermatozoonlarda AR'yi indükleyebilecek ajanlara tabi tutarak bu reaksiyonun belirlenmesini sağlamaktır (24). Bu amaçla Bryan boyası, trypan blue-Giemsa, nigrosin-eosin-Giemsa, fast green-eosin B, trypan blue-Bismarck

brown-rose Bengal boyaları ile yapılan boyamalar yaygın olarak kullanılmaktadır (1,20,26,29,30).

*In vitro* çalışmalarda değişik ekzogen faktör ya da maddelerin de akrozom reaksiyonunu farklı ölçülerde indüklediği belirtilmektedir. Bunlar arasında zona pellucida ya da kumulus-oosit kompleksinin komponentleri, füzogenik lipitler, kalsiyum iyonoforları ve  $Ca^{+2}$  iyonlarının eksternal mantıplasyonları (22,28); spermatozoon fosfolipaz A2 etkisi ile üretilen lizofosfatidler (13,17,23); füzogenik bir lipid olan LPC (23) değişik defterjanlar (13) sayılabilir.

Boyama yöntemi ile spermatozoonlarda AR değerlendirilen Cross ve Meizel (7), reaksiyona uğrayan hücrelerin akrozomlarının boya almadığı halde reaksiyona girmeyenlerin boya aldığını bildirmiştir. Bryan boyası ile hücreleri boyayan Polerme ve Steirteghem (20) de reaksiyon geçirmemiş spermatozoonların baş sınırlarının yeşil, çekirdeğin koyu sarı renkte, reaksiyon geçirmiş olanlarda ise uniform sarı renkte olduğunu gözlemiştir. Yine ikili boyama yöntemi (dual stain) ile optimum 8-10 dakikalık boyama süresinde ölü ve canlı spermatozoonlar ile gerçek ve yalancı AR belirlenmesi yapıldığı belirtilmektedir (26).

Bu araştırma *in vitro* fertilizasyon çalışmalarının çok önemli bir aşaması olan ve eide edilecek başarıyı doğrudan etkileyen *in vitro* spermatozoa kapasitasyonu üzerine yapılmıştır. Bu amaçla heparin, heparin+kafein ve kafein+kalsiyum iyonofor olmak üzere üç grup oluşturulmuş ve bu kapasitör ajanların etkileri incelenmiştir.

### Materyal ve Metot

Araştırmada dondurulmuş boğa spermatozoonlarının *in vitro* kapasitasyonları sağlanarak kullanılan kapasitör maddelerin etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla kullanılan heparin farklı süreler ve dozlarda, kafein ile heparin ve kafein ile kalsiyum iyonoforun farklı dozları birbirleri ile kombine edilerek kullanılmıştır. Kapasitasyonun belirlenmesi için akrozom reaksiyonu lizofosfatidilkolin ile indüklenmiş ve sonrasında trypan blue ve Giemsa ile boyanmaları sağlanmıştır.

#### Kullanılan medyumlar

Çalışmanın 1. ve 2. gruplarında sp-TALP (20), 3. grubunda ise Brackett ve Oliphant (BO) mediyumu (21) kullanıldı.

#### Spermanın deneye hazırlanması

Deneylerde 0,25 ml'lik payetlerde dondurulmuş boğa sperması kullanıldı. Çözülen spermalar 500 g'de 10'ar dakika santrifüj edilerek iki kez yıkandı ve ml'de yaklaşık  $10 \times 10^6$  hücre olacak şekilde yine aynı mediyumla dilüe edildi.

### Heparin (H) ile kapasitasyon

Deneye hazırlanan sperma, 10, 25 ve 100 µg/ml heparin (sodyum tuzu) ile 5, 15 ve 60'ar dakikalık sürelerde inkübasyona bırakıldı.

### Heparin (H) ve kafein (K) ile kapasitasyon

Bu grupta kafein (sodyum benzoat tuzu) 5, 10 ve 15 mM, heparin ise 0, 5, 10 ve 25 mg/ml kullanıldı. Kafein santrifüj öncesinde, heparin santrifüj sonrasında eklenerek 10 dakika daha inkübasyona bırakıldı.

### Kafein (K) ve kalsiyum iyonofor (Ki) ile kapasitasyon

Bu grupta kafein 0, 5 ve 10 mM, kalsiyum iyonofor (A23187) ise 0.1, 0.2 ve 0.3 µM'lük konsantrasyonlarda kullanıldı. Sperma bu grupta kafein içeren ancak BSA içermeyen BO mediumuyla santrifüj edilerek yıkandıktan sonra kalsiyum iyonofor A23187 ilavesi yapıldı. Tam bir dakika sonra ise A23187'nin etkisini durdurmak için 2 mg/ml BSA ilave edildi.

### Akrozom reaksiyonun indüklenmesi

100 µg /ml dozunda lizofosfatidilkolin ile 15 dak. süre ile inkübasyona bırakıldı. (24).

Tablo 1. Heparin dozuna bağlı canlı, reaksiyon oluşmamış spermatozoon ortalamaları (%).

Table 1. Effect of heparin dosages on *in vitro* capacitation (% live sperm with intact acrosome).

Heparin (µg/ml)	X ± Sx (%)	n	Minimum(%)	Maksimum(%)
10	62,844 ± 0,644 <sup>b</sup>	24	61,519	64,168
25	59,832 ± 0,644 <sup>a</sup>	24	58,508	61,157
100	53,900 ± 0,644 <sup>a</sup>	24	52,576	55,225
Kontrol	75,234 ± 0,744 <sup>c</sup>	18	73,704	76,763

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemlidir.

ba: p<0.01 bc: ca: p<0.001

<sup>b</sup> vs <sup>a</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.01 level.

<sup>b,c</sup> vs <sup>c,a</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

Tablo 2. Heparinle inkübasyon süresine bağlı canlı, reaksiyon oluşmamış spermatozoon ortalamaları (%).

Table 2. Effect of incubation period of heparin-treated spermatozoa on *in vitro* capacitation (% live sperm with intact acrosome).

Inkübasyon süresi (Dak.)	X ± Sx (%)	n	Minimum(%)	Maksimum(%)
5	67,953 ± 0,528 <sup>a</sup>	24	66,867	69,039
15	63,066 ± 0,648 <sup>b</sup>	24	61,734	64,398
60	57,839 ± 0,524 <sup>c</sup>	24	56,762	58,916

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemlidir (p<0,001).

<sup>a,b,c</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

### Reaksiyonunun belirlenmesi

% 0,1'lik trypan blue ve %10'luk Giemsa ile ikili boyama yöntemi (26) uygulandı.

### Değerlendirme

Trypan blue ve Giemsa ile yapılan ikili boyama yönteminde spermatozoonlar dört farklı görüntü altında değerlendirildi. Gözlemler, trypan blue ile ölü spermatozoonların postakrozomal bölgelerinin mavi olarak boyanması, canlı olanların aynı bölgelerinin boya almadan kalması, Giemsa ile ise reaksiyon geçirmeyen spermatozoonların akrozomal bölgelerinin kırmızı-pembe renkte boyanırken reaksiyona uğrayanların akrozomal bölgelerinin boya almadan kalması esasına dayandırıldı. Buna göre canlı olup reaksiyona uğrayanlar gerçek AR, ölü olup reaksiyona uğrayanlar ise sahte AR olarak değerlendirildi (26).

### Bulgular

Yapılan çalışmada heparin (H) grubuna ait sonuçlar Tablo 1-8, heparin+kafein (H+K) grubuna ait sonuçlar Tablo 9-12 ve kafein+kalsiyum iyonofor (K+Ki) grubuna ait olanlar Tablo 13-15'de sunulmuştur.

Tablo 3. Heparin dozuna bağlı ölü, reaksiyon oluşmamış spermatozoon ortalamaları (%).

Table 3. Effect of heparin dosages on *in vitro* capacitation (% dead sperm with intact acrosome).

Heparin (µg/ml)	X ± Sx (%)	n	Minimum(%)	Maksimum(%)
10	21,744 ± 0,597 <sup>a</sup>	24	20,516	22,971
25	19,386 ± 0,597 <sup>a</sup>	24	18,159	20,614
100	20,447 ± 0,597 <sup>a</sup>	24	19,219	21,674
Kontrol	12,792 ± 0,597 <sup>b</sup>	18	11,374	14,209

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemlidir (p<0.05).

<sup>a,b</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.05 level.

Tablo 4. Heparinle inkübasyon süresine bağlı ölü, reaksiyon oluşmamış spermatozoon ortalamaları (%).

Table 4. Effect of incubation period of heparin-treated spermatozoa on *in vitro* capacitation (% dead sperm with intact acrosome).

Inkübasyon süresi (Dak.)	X ± Sx (%)	n	Minimum(%)	Maksimum(%)
5	17,597 ± 0,419 <sup>a</sup>	24	16,736	18,459
15	18,412 ± 0,624 <sup>ab</sup>	24	17,128	19,695
60	19,768 ± 0,552 <sup>b</sup>	24	18,634	20,901

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemlidir (p<0.05).

<sup>a,b</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.05 level.

Tablo 5. Heparin dozuna bağlı canlı, reaksiyon oluşmuş spermatozoon ortalamaları (%).

Table 5. Effect of heparin dosages on *in vitro* capacitation (% live sperm with detached acrosome).

Heparin (µg/ml)	X ± Sx (%)	n	Minimum (%)	Maksimum (%)
10	11,382 ± 0,381 <sup>c</sup>	24	10,599	12,165
25	16,371 ± 0,381 <sup>b</sup>	24	15,588	17,154
100	21,167 ± 0,381 <sup>a</sup>	24	20,383	21,950
Kontrol	8,413 ± 0,440 <sup>d</sup>	18	7,509	9,318

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemlidir (p<0.001).

<sup>a,b,c,d</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

Tablo 6. Heparinle inkübasyon süresine bağlı canlı, reaksiyon oluşmuş spermatozoon ortalamaları (%).

Table 6. Effect of incubation period of heparin-treated spermatozoa on *in vitro* capacitation (% live sperm with detached acrosome).

Inkübasyon süresi (Dak.)	X ± Sx (%)	n	Minimum (%)	Maksimum (%)
5	10,919 ± 0,313 <sup>a</sup>	24	10,275	11,562
15	14,688 ± 0,476 <sup>b</sup>	24	13,709	15,666
60	17,393 ± 0,419 <sup>c</sup>	24	16,531	18,255

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemlidir (p<0.001).

<sup>a,b,c</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

Tablo 7. Heparin dozuna bağlı ölü, reaksiyon oluşmuş spermatozoon ortalamaları (%).

Table 7. Effect of heparin dosages on *in vitro* capacitation (% dead sperm with detached acrosome).

Heparin (µg/ml)	X ± Sx (%)	n	Minimum (%)	Maksimum (%)
10	4,008 ± 0,163 <sup>b</sup>	24	3,673	4,343
25	4,403 ± 0,163 <sup>b</sup>	24	4,068	4,739
100	4,465 ± 0,163 <sup>b</sup>	24	4,129	4,800
Kontrol	3,541 ± 0,188 <sup>a</sup>	18	3,154	3,928

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemlidir (p<0.05).

<sup>a,b</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.05 level.

Tablo 8. Heparinle inkübasyon süresine bağlı ölü, reaksiyon oluşmuş spermatozoon ortalamaları (%).

Table 8. Effect of incubation period of heparin-treated spermatozoa on *in vitro* capacitation (% dead sperm with detached acrosome).

Inkübasyon süresi (Dak.)	X ± Sx (%)	n	Minimum (%)	Maksimum (%)
5	3,509 ± 0,169 <sup>a</sup>	24	3,163	3,856
15	3,814 ± 0,157 <sup>a</sup>	24	3,490	4,137
60	4,990 ± 0,196 <sup>b</sup>	24	4,588	5,392

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemlidir (p<0.05).

<sup>a,b</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.05 level.

Tablo 9. 5 mM, 10 mM ve 15 mM kafein (K) ile 0 µg/ml heparine (H) ait bulgular (%).

Table 9. Effect of caffeine (5 mM, 10 mM, 15 mM) plus heparin (0 µg/ml) on *in vitro* capacitation (%).

Hücre tipi	Kapasitör	n	X ± Sx (%)	Minimum (%)	Maksimum (%)
Canlı reaksiyon (-)	5K+0H	8	60,586 ± 1,217 <sup>b</sup>	57,010	67,160
	10K+0H	8	57,045 ± 0,883 <sup>a</sup>	53,520	61,770
	15K+0H	8	56,331 ± 1,213 <sup>a</sup>	51,000	61,410
	Kontrol	6	73,650 ± 1,149 <sup>c</sup>	70,410	77,180
Ölü reaksiyon (-)	5K+0H	8	15,210 ± 0,729	10,940	17,670
	10K+0H	8	16,337 ± 0,765	13,130	19,240
	15K+0H	8	15,523 ± 1,336	10,080	20,290
	Kontrol	6	13,645 ± 1,068	8,720	16,110
Canlı reaksiyon (+)	5K+0H	8	19,526 ± 0,582 <sup>b</sup>	17,350	21,920
	10K+0H	8	21,843 ± 0,721 <sup>a</sup>	18,530	25,320
	15K+0H	8	23,326 ± 0,901 <sup>a</sup>	20,740	27,380
	Kontrol	6	8,218 ± 0,454 <sup>c</sup>	6,100	9,060
Ölü reaksiyon (+)	5K+0H	8	4,663 ± 0,257	3,500	6,020
	10K+0H	8	4,752 ± 0,331	3,160	6,170
	15K+0H	8	4,797 ± 0,589	2,210	7,450
	Kontrol	6	4,470 ± 0,552	2,670	6,660

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemlidir (p<0.001).

<sup>a,b,c</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

Tablo 10. 5 mM, 10 mM ve 15 mM kafein (K) ile 5 µg/ml heparine (H) ait bulgular (%).  
Table 10. Effect of caffeine (5 mM, 10 mM, 15 mM) plus heparin (5 µg/ml) on *in vitro* capacitation (%).

Hücre tipi	Kapasitör	n	X ± Sx (%)	Minimum (%)	Maksimum (%)
Canlı reaksiyon (-)	5K+5H	8	57,550 ± 1,082 <sup>a</sup>	54,600	63,240
	10K+5H	8	56,633 ± 1,298 <sup>a</sup>	51,960	62,820
	15K+5H	8	53,837 ± 1,389 <sup>a</sup>	48,730	61,060
	Kontrol	6	73,650 ± 1,149 <sup>b</sup>	70,410	77,180
Ölü reaksiyon (-)	5K+5H	8	16,165 ± 0,758	13,020	19,680
	10K+5H	8	16,983 ± 0,590	15,530	20,670
	15K+5H	8	16,275 ± 1,221	10,630	21,000
	Kontrol	6	13,645 ± 1,068	8,720	16,110
Canlı reaksiyon (+)	5K+5H	8	21,291 ± 0,552 <sup>a</sup>	18,570	23,750
	10K+5H	8	21,490 ± 1,062 <sup>a</sup>	16,230	25,670
	15K+5H	8	25,280 ± 1,028 <sup>b</sup>	20,790	30,560
	Kontrol	6	8,218 ± 0,454 <sup>c</sup>	6,100	9,060
Ölü reaksiyon (+)	5K+5H	8	4,981 ± 0,514	2,370	6,690
	10K+5H	8	4,872 ± 0,362	3,750	6,760
	15K+5H	8	4,586 ± 0,549	3,340	7,390
	Kontrol	6	4,470 ± 0,552	2,670	6,660

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistiki açıdan önemlidir (p<0.001).  
<sup>a,b,c</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

Tablo 11. 5 mM, 10 mM ve 15 mM kafein (K) ile 10 µg/ml heparine (H) ait bulgular (%).  
Table 11. Effect of caffeine (5 mM, 10 mM, 15 mM) plus heparin (10 µg/ml) on *in vitro* capacitation (%).

Hücre tipi	Kapasitör	n	X ± Sx (%)	Minimum (%)	Maksimum (%)
Canlı reaksiyon (-)	5K+10H	8	57,948 ± 0,740 <sup>a</sup>	55,000	61,000
	10K+10H	8	56,273 ± 0,608 <sup>a</sup>	54,080	59,130
	15K+10H	8	52,297 ± 0,907 <sup>b</sup>	48,330	55,760
	Kontrol	6	73,650 ± 1,149 <sup>c</sup>	70,410	77,180
Ölü reaksiyon (-)	5K+10H	8	15,737 ± 0,661	13,280	18,850
	10K+10H	8	15,260 ± 0,669	12,710	17,460
	15K+10H	8	16,841 ± 0,767	14,530	20,140
	Kontrol	6	13,645 ± 1,068	8,720	16,110
Canlı reaksiyon (+)	5K+10H	8	21,395 ± 0,572 <sup>a</sup>	19,130	23,820
	10K+10H	8	23,237 ± 0,719 <sup>a</sup>	20,080	25,900
	15K+10H	8	25,457 ± 0,756 <sup>b</sup>	21,190	28,380
	Kontrol	6	8,218 ± 0,454 <sup>c</sup>	6,100	9,060
Ölü reaksiyon (+)	5K+10H	8	4,897 ± 0,431	3,070	6,690
	10K+10H	8	5,210 ± 0,358	3,310	6,250
	15K+10H	8	5,372 ± 0,456	3,940	7,040
	Kontrol	6	4,470 ± 0,552	2,670	6,660

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistiki açıdan önemlidir (p<0.001).  
<sup>a,b,c</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

Tablo 12. 5 mM, 10 mM ve 15 mM kafein (K) ile 25 µg/ml heparine (H) ait bulgular (%).  
Table 12. Effect of caffeine (5 mM, 10 mM, 15 mM) plus heparin (25 µg/ml) on *in vitro* capacitation (%).

Hücre tipi	Kapasitör	n	X ± Sx (%)	Minimum (%)	Maksimum (%)
Canlı reaksiyon (-)	5K+25H	8	56,117 ± 0,800 <sup>a</sup>	52,470	59,040
	10K+25H	8	53,645 ± 1,094 <sup>ab</sup>	46,180	55,300
	15K+25H	8	50,322 ± 2,173 <sup>b</sup>	40,430	59,380
	Kontrol	6	73,650 ± 1,149 <sup>c</sup>	70,410	77,180
Ölü reaksiyon (-)	5K+25H	8	16,668 ± 0,560	15,000	19,430
	10K+25H	8	17,398 ± 0,617	15,100	20,170
	15K+25H	8	15,597 ± 1,245	10,890	20,930
	Kontrol	6	13,645 ± 1,068	8,720	16,110
Canlı reaksiyon (+)	5K+25H	8	21,766 ± 0,816 <sup>a</sup>	19,440	25,740
	10K+25H	8	23,902 ± 0,629 <sup>a</sup>	20,970	26,900
	15K+25H	8	28,440 ± 1,472 <sup>b</sup>	21,600	35,330
	Kontrol	6	8,218 ± 0,454 <sup>c</sup>	6,100	9,060
Ölü reaksiyon (+)	5K+25H	8	5,430 ± 0,312	4,120	6,480
	10K+25H	8	5,031 ± 0,381	3,530	6,720
	15K+25H	8	5,621 ± 0,661	3,420	8,100
	Kontrol	6	4,470 ± 0,552	2,670	6,660

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistiki açıdan önemlidir (p<0.001).  
<sup>a,b,c</sup> Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

Tablo 13. 0,1 µM, 0,2 µM ve 0,3 µM kalsiyum iyonofor (Ki) ile 0 mM kafeine (K) ait bulgular (%).  
Table 13. Effect of calcium ionophore (0,1 µM, 0,2 µM, 0,3 µM) plus caffeine (0 mM) on *in vitro* capacitation (%).

Hücre tipi	Kapasitör	n	X ± Sx (%)	Minimum (%)	Maksimum (%)
Canlı reaksiyon (-)	0K+0,1 Ki	8	69,365 ± 0,598 <sup>b</sup>	66,180	73,910
	0K+0,2 Ki	8	66,883 ± 0,804 <sup>ab</sup>	63,830	71,310
	0K+0,3 Ki	8	64,665 ± 0,930 <sup>a</sup>	61,530	69,300
	Kontrol	6	74,413 ± 0,598 <sup>c</sup>	72,620	76,540
Ölü reaksiyon (-)	0K+0,1 Ki	8	15,738 ± 0,939	12,010	20,140
	0K+0,2 Ki	8	16,248 ± 0,797	13,130	19,390
	0K+0,3 Ki	8	17,463 ± 0,957	12,700	22,110
	Kontrol	6	13,680 ± 0,392	11,930	14,820
Canlı reaksiyon (+)	0K+0,1 Ki	8	10,401 ± 0,521 <sup>a</sup>	8,540	12,980
	0K+0,2 Ki	8	12,146 ± 0,795 <sup>ab</sup>	8,910	15,620
	0K+0,3 Ki	8	13,128 ± 0,641 <sup>b</sup>	10,390	15,910
	Kontrol	6	8,060 ± 0,000 <sup>c</sup>	7,880	8,370
Ölü reaksiyon (+)	0K+0,1 Ki	8	4,476 ± 0,211	3,840	5,590
	0K+0,2 Ki	8	4,727 ± 0,328	3,160	6,170
	0K+0,3 Ki	8	4,721 ± 0,309	3,960	6,630
	Kontrol	6	3,830 ± 0,248	3,000	4,560

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistiki açıdan önemlidir (p<0.001).  
a,b,c Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

Tablo 14. 0,1 µM, 0,2 µM ve 0,3 µM kalsiyum iyonofor (Ki) ile 5 mM kafeine (K) ait bulgular (%).  
Table 14. Effect of calcium ionophore (0,1 µM, 0,2 µM, 0,3 µM) plus caffeine (5 mM) on *in vitro* capacitation (%).

Hücre tipi	Kapasitör	n	X ± Sx (%)	Minimum (%)	Maksimum (%)
Canlı reaksiyon (-)	5K+0,1 Ki	8	60,772 ± 1,027 <sup>a</sup>	57,200	66,150
	5K+0,2 Ki	8	56,381 ± 1,111 <sup>b</sup>	51,040	62,050
	5K+0,3 Ki	8	52,537 ± 0,764 <sup>c</sup>	49,360	54,950
	Kontrol	6	74,413 ± 0,598 <sup>d</sup>	72,620	76,540
Ölü reaksiyon (-)	5K+0,1 Ki	8	15,186 ± 0,645	11,780	17,470
	5K+0,2 Ki	8	15,376 ± 1,152	10,960	18,940
	5K+0,3 Ki	8	16,883 ± 0,680	14,850	20,000
	Kontrol	6	13,680 ± 0,392	11,930	14,820
Canlı reaksiyon (+)	5K+0,1 Ki	8	19,220 ± 0,538 <sup>a</sup>	17,110	22,070
	5K+0,2 Ki	8	23,635 ± 0,609 <sup>b</sup>	22,020	26,400
	5K+0,3 Ki	8	25,338 ± 0,549 <sup>c</sup>	22,320	27,270
	Kontrol	6	8,060 ± 0,000 <sup>d</sup>	7,880	8,370
Ölü reaksiyon (+)	5K+0,1 Ki	8	4,800 ± 0,234	3,910	6,090
	5K+0,2 Ki	8	4,587 ± 0,372	3,370	6,570
	5K+0,3 Ki	8	5,220 ± 0,401	3,840	6,920
	Kontrol	6	3,830 ± 0,248	3,000	4,560

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistiki açıdan önemlidir (p<0.001).  
a,b,c,d Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

Tablo 15. 0,1 µM, 0,2 µM ve 0,3 µM kalsiyum iyonofor (Ki) ile 10 mM kafeine (K) ait bulgular (%).  
Table 15. Effect of calcium ionophore (0,1 µM, 0,2 µM, 0,3 µM) plus caffeine (10 mM) on *in vitro* capacitation (%).

Hücre tipi	Kapasitör	n	X ± Sx (%)	Minimum (%)	Maksimum (%)
Canlı reaksiyon (-)	10K+0,1 Ki	8	57,061 ± 1,462 <sup>a</sup>	51,720	64,780
	10K+0,2 Ki	8	53,620 ± 1,337 <sup>a</sup>	49,580	60,460
	10K+0,3 Ki	8	48,985 ± 0,677 <sup>b</sup>	43,310	57,580
	Kontrol	6	74,413 ± 0,598 <sup>c</sup>	72,620	76,540
Ölü reaksiyon (-)	10K+0,1 Ki	8	16,867 ± 0,635	14,950	20,850
	10K+0,2 Ki	8	16,256 ± 1,002	11,700	20,000
	10K+0,3 Ki	8	16,103 ± 0,074	12,260	21,050
	Kontrol	6	13,680 ± 0,392	11,930	14,820
Canlı reaksiyon (+)	10K+0,1 Ki	8	21,446 ± 1,145 <sup>a</sup>	15,490	26,100
	10K+0,2 Ki	8	25,407 ± 0,714 <sup>b</sup>	22,480	28,420
	10K+0,3 Ki	8	29,908 ± 0,938 <sup>c</sup>	24,900	34,430
	Kontrol	6	8,060 ± 0,000 <sup>d</sup>	7,880	8,370
Ölü reaksiyon (+)	10K+0,1 Ki	8	4,606 ± 0,278	3,750	5,850
	10K+0,2 Ki	8	4,698 ± 0,354	3,480	6,220
	10K+0,3 Ki	8	5,976 ± 0,412	3,860	6,890
	Kontrol	6	3,830 ± 0,248	3,000	4,560

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistiki açıdan önemlidir (p<0.001).  
a,b,c,d Different superscripts within a column are different at the p<0.001 level.

## Tartışma ve Sonuç

Araştırmadan elde edilen veriler arasında canlı, re-aksiyon olmuş spermatozoonlara ait olanlar oldukça önemli görülmektedir. Çünkü bu spermatozoonlar tüm manüplasyonlar sırasında canlı kalabilen ve mediuma ilave edilen maddenin etkisi ile kapasitasyona ve sonuçta akrozom reaksiyonuna uğrayan spermatozoonların oranını yansıtmaktadır.

Kullanılan heparin konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin baz olarak alındığı 1. grupta artan inkübasyon süresi ve dozun spermatozoonların kapasitasyon oranlarını arttırdığı, bunun yanında bu faktörlerin spermatozoonların yaşama yetenekleri üzerine önemli bir olumsuz etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Çalışmada elde edilen bu yöndeki bulgular Parrish ve ark. (22)'nin bulgularına benzerlik göstermektedirler. Fukui (10)'nin yaptığı çalışmada spermayı 100 µg/ml heparin içeren mediumda 15 dakika inkübe ettikten sonra %13-18 oranında akrozom reaksiyonu elde ettiğini bildirmiştir. Elde edilen bu oran bu çalışmada aynı doz ve sürede elde edilen orandan (%23.219) daha düşük bulunmuştur. Bu durum boğalar arasında bireysel farklılığa ve mediumun glukoz içermesine bağlanabilir. Handrow ve ark. (14)'nin yaptıkları ve 10 µg/ml heparinle 4 saat inkübe ettikleri spermada elde ettikleri %58±8 oranın bu çalışmada elde edilen oranlardan fazla olması ise yine bireysel farklılığa ve inkübasyon süresinin uzunluğuna bağlanabilir. Fukui ve ark. (11)'nin spermayı 0, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml heparinle 0, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 ve 240 dakika sürelerde inkübasyona bırakarak fertilizasyon oranlarına göre değerlendirdikleri çalışmada en yüksek fertilizasyon oranlarını heparinin 25 ile 100 µg/ml dozları arasında elde ederken en iyi inkübasyon sürelerinin 5 ile 60 dakika olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan 10, 25 ve 100 µg/ml heparinle fertilizasyon oranlarının artması bizim yaptığımız çalışmada AR oranlarının artması ile benzerlik göstermektedir.

Birbirleri ile yaygın şekilde kombinasyonları yapılarak *in vitro* kapasitasyon amacı ile kullanılan, heparin ile kafein ve kafein ile kalsiyum ionoforun değişik konsantrasyonlarının kapasitasyona ne derecede etkili olduğu çalışmadan çıkarılan diğer bir sonuçtur. Bu gruplarda kapasitör maddelerin toplam konsantrasyonlarının artmasının kapasitasyon üzerindeki olumlu etkiler yaptığı ve artan toplam konsantrasyona paralel kapasite olmuş spermatozoon oranlarının arttığı gözlenmiştir.

Bu sonuçlar, Niwa ve Ohgoda (19), Park ve ark. (21) ile Kim ve ark. (15)'nin fertilizasyon mediumuna ilave ettikleri kafein ve heparinin oosit penetrasyon oran-

larını belirgin oranda arttırdıklarını ( $p<0.001$ ) ve bu iki kapasitör maddenin kapasitasyon üzerinde sinerjik olarak etki ettiklerini bildirmeleri ile uyusmaktadır. Benzer bulgular kafein ve kalsiyum ionoforu kullanan Yang ve ark. (31) ile Aoyagi ve ark. (2) tarafından da bildirilmektedir.

Her üç grupta elde edilen en yüksek kapasitasyona uğramış spermatozoon oranları 1. grupta (100 µg/ml heparinle 60 dakika inkübasyon) %25.466, 2. grupta (15 mM kafein+25 µg/ml heparin) %28.440 ve 3. grupta (10 mM kafein+0,3 µM kalsiyum ionofor) %29.908 olarak bulundu. Buna göre kullanılan kapasitör maddeler arasında en iyi sonuçların 10 mM kafeinle 0,3 µM kalsiyum ionoforun kombinasyonundan elde edildiği görüldü. Bu oranların diğerlerine göre daha yüksek olması bir avantaj yaratmakla birlikte heparin grubunda tek bir kimyasal madde ile çalışma kolaylığı ve heparinin daha kolay ve ucuz bulunabilmesi bu gruba bir avantaj sağlamaktadır. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan tüm kapasitör maddelerin birbirlerine büyük bir üstünlük sağlayamadıkları ve her üç yönteminde *in vitro* kapasitasyon çalışmalarında kullanılabileceği görülmüştür.

## Kaynaklar

1. Aalseth EP, Saacke RG (1986): *Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm*. Gamete Res. **15**, 73-81.
2. Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, Furudate M, Fukui Y, Ono H (1988): *Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes*. Theriogenology, **30**, 973-985.
3. Bellin ME, Hawkins HE, Oyarzo JN, Vanderboom RJ, Ax RL (1996): *Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls*. J Anim Sci, **74**, 173-182.
4. Blotner S, Nehring H, Torner H (1990): *Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: Relationship to fertility*. Theriogenology, **34**, 619-628.
5. Calvete JJ, Dostálová Z, Sanz L, Aderman K, Hole HH, Töpfer-Petersen E (1996): *Mapping the heparin-binding domain of boar spermatheins*. FEBS Letters, **379**, 207-211.
6. Cao X, Ben K, Wang Y, Wang Y (1997): *Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid, progesterone and ionophore A23187 on acrosome reaction of tree shrew sperm in vitro: Examination of acrosome reaction with an improved fluorescence microscopy*. Anim Reprod Sci, **49**, 225-234.
7. Cross LN, Meizel S (1989): *Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm*. Biol Reprod, **41**, 635-641.
8. Didion BA, Graves CN (1986): *In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows*. J Anim Sci, **62**, 1029-1033.
9. Ellington JE, Ball BA, Blue BJ, Wilker CE (1993): *Capacitation-like membrane changes and prolonged viability*

- in vitro* of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. *Am J Vet Res*, **54**, 1505-1510.
10. **Fukui Y** (1990): Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, **26**, 40-46.
  11. **Fukui Y, Sonoyama T, Mochizuki H, Ono H** (1990): Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, **34**, 579-591.
  12. **Gordon I** (1994): *Laboratory Production of Cattle Embryos*. 143-169. In: GJ Persley (Ed), *Capacitating Sperm*. Cab International, Wallingford.
  13. **Graham JK, Foote RH, Parrish JJ** (1986): Effect of di-lauroylphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull spermatozoa into zona-free hamster egg. *Biol Reprod*, **35**, 413-424.
  14. **Handrow RR, First NL, Parrish JJ** (1989): Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool*, **252**, 174-182.
  15. **Kim CI, Ellington JE, Foote RH** (1990): Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM-199 and simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*, **33**, 433-440.
  16. **Lefebvre R, Suarez S** (1996): Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol Reprod*, **54**, 575-582.
  17. **Lin Y, Kan FWK** (1996): Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Biol Reprod*, **55**, 1133-1146.
  18. **Miller DJ, Winer MA, Ax RL** (1990): Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*, **42**, 899-915.
  19. **Niwa K, Ohgoda O** (1988): Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, **30**, 733-741.
  20. **Palermo G, Steirteghem AV** (1991): Enhancement of acrosome reaction and subzonal insemination of a single spermatozoon in mouse eggs. *Mol Reprod Dev*, **30**, 339-345.
  21. **Park CK, Ohgoda O, Niwa K** (1989): Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J Reprod Fert*, **86**, 577-582.
  22. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL** (1985): Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology*, **24**, 537-549.
  23. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL** (1989): Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod*, **41**, 683-699.
  24. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL** (1988): Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*, **38**, 1171-1180.
  25. **Saeki K, Kato H, Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A** (1991): Early morphological events of *in vitro* fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, **35**, 1051-1058.
  26. **Sidhu KS, Dhindsa JS, Guraya SS** (1992): A simple staining procedure for detecting the true acrosome reaction in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Biotech Histochem*, **67**, 35-39.
  27. **Sidhu KS, Guraya SS** (1989): Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int Rev Cytol*, **118**, 231-280.
  28. **Spungin B, Levinshal T, Rubinstein S, Breithart H** (1992): A cell free system reveals that capacitation is a prerequisite for membrane fusion during the acrosome reaction. *FEBS Letters*, **311**, 155-160.
  29. **Tamuli MK, Watson PF** (1994): Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim Reprod Sci*, **35**, 247-254.
  30. **Vázquez JM, Martínez E, Roca J, Coy P, Pastor LM** (1993): Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev*, **36**, 84-88.
  31. **Yang X, Jiang S, Foote RH** (1993): Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol Reprod Dev*, **34**, 94-100.
- Geliş tarihi: 20.3.2002 / Kabul tarihi: 25.4.2002
- Yazışma adresi:**  
Araş. Gör. Dr. Ilker Serin  
Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi  
Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı,  
09016 Işıklı, Aydın  
e-posta: ilkserin@hotmail.com