

Estradiol-17 β Hormonunun Boğa Spermlerinin Motilitesi, Canlılığı ve Akrozom Anormalliği Üzerine Etkisi

Hüseyin Baki ÇİFTÇİ^{1*}

¹Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, 42075 Kampüs-Konya

*Sorumlu Yazar
E-posta: hbciftci@selcuk.edu.tr

Geliş Tarihi: 30 Mayıs 2017
Kabul Tarihi: 15 Aralık 2017

Özet

Bu çalışmanın amacı boğaların fito-estrogen içeren bitkileri yemesi sonucu vücutlarına aldıkları estrogenik etkiye sahip fito-estrogenlerin sperm parametreleri üzerine etkisini kültür ortamına estradiol-17 β (E₂) ekleyip ölçmektir. Holstein boğalarından alınan semen E₂ içermeyen (C, Kontrol) veya 2 (T1), 4 (T2), ve 8 μ g (T3) E₂/mL içeren kültür ortamında 24 saat tutuldular. İnkübasyon periyodunun 0, 4, 18 ve 24. saatlerinde canlı, hareketli, akrozomu zarar görmüş veya kaybolmuş, sitoplazmik çıkıntı ve kuyruk anormalliği taşıyan sperm sayıları bulundu. Kültür ortamına 2 μ g E₂/mL ilavesi sonucu toplam motilite inkübasyon süresinin 18. saatinde kontrol grubuna kıyasla arttı. Kültür ortamına 2 ve 8 μ g E₂/mL ilave edilmesi sonucu kültür periyodunun 4. saatinde ileri hareket eden sperm sayısı kontrol grubuna kıyasla önemlenseviyede yüksekti. Düşük dozda E₂ (2 ve 4 μ g/mL) ilavesi sperm canlılığını etkilemedi fakat yüksek dozda E₂ (8 μ g/mL) ilavesi inkübasyon periyodunun 4. ve 24 saatinde kontrol grubuna kıyasla sperm canlılığında azalmaya neden oldu. Kültür periyodunun 24. saatinde kontrol grubundaki akrozom taşımayan sperm sayısı önemli seviyede yüksekti. Mevcut veriler E₂ ilavesinin hareketli sperm sayısını artırdığını gösterse de yalnız motilite sperm hücrelerinin dölleme gücünü gösteren bir parametre değildir nitekim E₂ ilavesi membran bütünlüğüne kültür periyodunun 4. ve 18. saatlerde istatistiksel bakımdan önemli olmasa da olumsuz yönde etkisi olmuştur. Mevcut verilere dayanarak E₂ ilavesinin boğa spermının dölleme gücünü artırdığı ya da kısırılığa neden olduğu söylenemez.

Anahtar kelimeler: Boğa, Estradiol, Morfoloji, Motilite, Sperm

The Effect of Estradiol-17 β on Motility, Viability and Acrosome Anomaly of Bull Sperm

Abstract

The objective of this study was to measure the effect of adding estradiol-17 β (E₂) on sperm parameters in culture. This is because of the exposure of bulls to the estrogenic effect of phyto-estrogens in plants. Semen obtained from the Holstein bulls was divided into 4 groups and cultured in medium without E₂ (C, Control) or cultured in medium containing 2 (T1), 4 (T2) or 8 μ g (T3) E₂ for 24h. The number of live, motile, sperm cells bearing damaged or lost acrosomes, sperm cells bearing cytoplasmic droplets and abnormal tails were counted at the 0th, 4th, 18th and 24th hours of incubation. Addition of 2 μ g E₂/mL to sperm culture increased the number of total motile sperm cells at 18th hours of incubation as compared to the control group. At the 4th hours of the incubation, the numbers of forward moving sperm cells were significantly higher in cultures supplemented with 2 or 8 μ g E₂/mL as compared to the control groups. Supplementation of lower doses of E₂ (2 or 4 μ g/mL) did not influence the viability, but higher dose E₂ (8 μ g/mL) decreased the viability at 4th and 24th hours of incubation as compared to control group. The number of sperm cells with lost acrosome at 24th hours of incubation was significantly higher in control group as compared to others. Even the data, presented here, show that the addition of E₂ increase the number of motile sperm cells, but increased number of motile sperm cells is only not the parameter showing fertilizing ability of sperm. Also addition of E₂ caused non-significant damages to the membrane integrity of sperm cells at 4th and 18th hours of incubation. It cannot be said that supplementation of E₂ increase the fertilizing potential of sperm cells according to the data presented here.

Keywords: Bull, Estradiol, Morphology, Motility, Sperm

GİRİŞ

Hayvan beslemede önemli olan bitkiler (Örneğin; yonca, üçgül) önemli derecede fito-estrogen içermektedirler[1]. Ekstansiv koşullarda yetiştirilen hayvanlar estrogen ihtiva eden bitkilerin etkisi altındadırlar. Üçgül ve yonca gibi bitkileri fazlaca içeren meralarda otlayan hayvanların fazla miktarda fito-estrogen vücutlarına almaları mümkündür. Yem bitkilerinde bulunan fito-estrogenler bilimsel olarak

izoflavonlar, kumestainler ve lignanlar olmak üzere üç gurup altında ele alınmaktadır[2]. Fito-estrogenlerin en genel formunu izoflavonlar oluşturur. Bu nedenle en fazla izoflavonlar üzerinde çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. Bitkilerde bulunan majör izoflavonlar glikozit formunda bulunan Daidzin ve Genistin biyolojik olarak aktif değildirler. Hayvanın yediği yemdeki Daidzin ve Genistin rumen mikroorganizmaları tarafından metabolize edilerek bioaktif form olan Daidzein ve Genistein'e dönüştürülürler.

Daidzein ve genisteinin moleküler yapısı estrojene (özellikle Estradiol-17 β) oldukça benzer[3]. Bu nedenle bu maddeler estradiol-17 β (E₂) reseptörüne bağlanarak hem estrojenik hem de anti-estrojenik etki yapabilirler[4].

Üçgül ve yonca gibi bitkilerin fazlaca bulunduğu meralarda otlayan hayvanlarher gün yedikleri yemin her kilogramı için 907-1195 mg izoflavon vücutlarınaalır[5]. Üçgül yoğunluklu meralarda otlayan hayvanlar günlük yedikleri yemin kuru madde ağırlığının %0.05- 4.8'i oranında isoflavon vücutlarına alırlar[5].Dışarıdan yemlerle birlikte vücuda alınan fito-estrogenler hayvanların üreme faaliyetini etkileyebilir. Bitkisel estrogenlerin üreme ile alakası ilk olarak 1940 yılında ileri sürüldü[6,7]. Güneybatı Avustralya'nınotlaklarında *Trifoliumsubterraneum*yiye koyunlarda görülen infertilite sendromuna sebep olarak bu bitkinin estrogen içermesi gösterildi. Aynı şekilde sığır rasyonlarında fito-estrogenlerin mevcut olması hormonal dengesizliğe, hipofiz ile ovaryum arasındaki ilişkinin değişmesine sebep olduğu bildirildi[8].

Uzun bir zamandan beriermekte testesteron hormonu dominant cinsiyet hormonu olarak biliniyor; amainsan testisinde birçok noktada E₂hormonunun tespit edilir seviyede bulunması E₂'nin spermatogenez olayında rol aldığınıdüşündürüyor.Erkeklerde biyolojik olarak aktif olan estrogen;E₂ dir. Bu hormon vücuttestesteronun aromatize edilmesi sonucu sentezlenir[9,10,11]. Testisteki spermatogenez olayı her seviyede E₂tarafından regüle edilir. Buregülasyon hipotalamus, hipofiz ve gonat üçgeninden başlar takiben Leydig, Sertoli, germinal hücrelerinin fonksiyonlarının, *vas deferens*'in, *epididymis*'in ve olgun sperm oluşumununregülasyonuna kadar sürür[12]. İnsanda kandaki testosteronunE₂'ye oranı anormal düzeyde olması semen parametrelerindeki azalmaya neden olur. Bu durumda erkeğe aromataz inhibitörü ile muamele edilmesi sperm motilitesine, morfolojisine ve konsantrasyonuna olumlu etki yapar[13].

Boğa hariç birçok hayvan testisinde (insan, fare, köpek, kedi vs)E₂reseptörlerinin (α ve β)mevcut olduğu gösterilmiştir[14].Estrojen reseptörü- β elongasyona girmiş spermatitler hariç testisteki tüm hücrelerde vardır. Fakat insan dâhil birkaç hayvan türünde E₂reseptörü- α yoktur[14,15,16].

İzoflavonlardan genistein yapı bakımından E₂'ye oldukça benzer ve daha çok E₂reseptörü- β 'a bağlanır. GenisteinE₂'nin gösterdiği etki potansiyelinin 1/1200'nü gösterir. Daidzein de yapısal olarak E₂'ye benzer fakat E₂reseptörlerine bağlanma gücü genistein'in bağlanma gücünden düşüktür. Daidzen'in etki potansiyeliE₂'nin gösterdiği etki potansiyelinin yaklaşık 1/1000-1/100 000 kadardır[17,18,19].İsoflavon içeren yem bitkileri testisteki spermatogenezve spermiyogenez olaylarını etkileyebilirler. İzoflavonların fare spermelerinin fonksiyonuna etkisi deneysel olarak E₂enjekte edildi. Fareler 0.1 μ g/kg/gün E₂enjekte edilmesi sonucu sperm motilitesi azaldı fakat dölleme gücünü ve gebe kalma oranını etkilemedi aynı zamanda serum Lüteinleştirici Hormon (LH), Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH), Prolaktin (P) konsantrasyonlarında değişmeye neden olmadı, ama enjeksiyon dozu artırılıp 100-1000 μ g/kg/gün düzeyinde enjekte edildiğinde motilitedeki, dölleme gücünü, gebe kalma oranını, serum LH, FSH ve testesteron konsantrasyonlarını önemli derecede düşürdü[21]. Bu durum E₂'nin doza bağlı olarak etki gösterdiğini ifade ediyor. Sadece doza bağımlı değil aynı zamandaE₂'nin etkisi, hayvanın türüne, cinsiyetine, yaşına, fizyolojik durumuna ve

dozun uygulama şekline göre de değişir.

Estrojenlerinboğa spermeleri üzerine etkisi konusunda yeterli veri yoktur fakat estrogenlerin *caput epididymis*'deki luminal sıvı absorpsiyonunu azalttığı ve böylece spermelerin *corpus epididymis*'e seyreltilmiş halde bildirilmiştir[22]. Bu durum büyük bir ihtimalle morfolojik anormalliklere ve buna bağlı olarak infertilite'ye sebep olabilir.Diğer taraftan dişi hayvanların kanlarında kızgınlık ve ovulasyon sırasındaE₂'ninkonsantrasyonu artar. İnseminasyon sırasında spermeler uterus tüplerindeki sıvıda bulunan e sebep olabilir. Diğer taraftan dişi hayvanların kanlarında kızgınlık ve ovulasyon sırasında E₂ile karşılaşır. Bu sürede dişinin üreme kanalında E₂hormonunun mevcut olması sperm motilitesini regüle edebilir ve canlı kalma süresini uzatabilir[23]. Böylece bu çalışmanın amacı *in vitro* ortamda boğa spermelerine E₂ekleyipsperm parametreleri üzerine etkisini ölçmektir.

MATERYALLER ve METOTLAR

Semen Alma, Seminal Plazmayı Uzaklaştırma ve Konsantrasyon Ayarlama

Semen Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Orhan Düzgüneş Eğitim ve Araştırma Çiftliğindebulunan 2 yaşındakiHolstein boğalarından (n=3) dokuz ay boyunca saat 09:00-11:00 arasında suni vajina yardımıyla beş defa alındı.Boğalardan alınan semen 50 mL'lik santrifüj tüpünde (C-8296, Sigma, Steinheim, Almanya) birleştirildi. Tüp 37 °C de iki saat içinde laboratuara getirildi. Seminal plazmayı uzaklaştırmak için semene 0.06 mg/mL penicillin-G (Potasyum tuzu, kat: P7794, Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63103, Missouri, ABD) içeren fostatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS, kat: P5493, Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) eklenerek 19°C de beşdakika süreyle1500 rpm de santrifüj'etabi tutuldu. Santrifüj sonunda elde edilen sperm pelletine PBS ilave edilerek sperm konsantrasyonu 5x10⁸/mL olacak şekilde ayarlandı.

Estradiol-17 β Solüsyonunu Hazırlanması, Gruplama, Doz ve İnkübasyon

1.52 mg estradiol-17 β (E₂) (Kat: E1024, Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63103, Missouri, ABD) etanol içerisinde çözüldü ve PBS (Kat: P5493, Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) ile konsantrasyonu 0.4 μ g/ μ L olarak ayarlandı. Yıkamış sperm hücrelerini içeren 2,5 mL PBS dört petri kutusunun (35 x 10 mm, P5112, Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) her birine eklendi. E₂içermeyen petri kutusu kontrol (C) grubu olarak işaretlenirken 2, 4 ve 8 μ g E₂/mL E₂ içeren petri kutuları sırasıyla T1, T2 ve T3 test grupları olarak işaretlendi. Estradiol-17 β ilavesinden sonra petri kutuları 18,5 °C deki inkübatörde (Heraeus, Heracell 150) 24 saat kültüre alındı. Kültür periyodunun 0, 4, 18, ve 24. saatlerinde hareketli,canı, ölü ve morfolojilerianormalolanspermeler iki ayrı kişi tarafından kapalısayıldı.

Nigrosin –Eosin (NE) ve NE-Giemsa Boyalarını Hazırlanması ve Boyama

Bir gram nigrosin (Kat: 1.15924, Merck, Darmstadt, Almanya) ve 6.7 mL Eosin (Kat: 45242,sarı, Fluka, Steinheim, Almanya) karıştırıldı sonra üzerine 6ml ultra saf su eklendi. Karışım 20 dakika 100 °C'deki su banyosuna bırakılarak çözüldü ve filtredildi ve boyanın konulduğu ilk kap 6 mL tartrat tamponuyla yıkandı. Sonra boyayaglikoz solüsyonundan (100 g/L, Kat: G8644, Sigma-Aldrich, St

Tablo 1. İnkübasyon periyodunun 0., 4., 18. ve 24 saatlerinde kontrol (C) ve test gruplarındaki (T1, T2 ve T3) canlı sperm sayıları (%). Veriler ortalama (ort.) ± ortalamanın standart hatası (o.s.h.) olarak yazılmıştır.

| Gruplar | Canlı sperm oranı (%) | | | |
|---------|-----------------------|----------------------------|--------------|---------------------------|
| | 0. Saat | 4. Saat | 18. Saat | 24. Saat |
| C | 67.5±3.26 | 60.63 ^a ± 5.74 | 48.14 ± 1.76 | 39.27 ^a ± 2.46 |
| T1 | 67.5±3.26 | 59.03 ^{ab} ± 4.25 | 46.40 ± 4.33 | 40.92 ^a ± 2.29 |
| T2 | 67.5±3.26 | 56.69 ^{ab} ± 5.72 | 46.02 ± 3.05 | 42.61 ^a ± 1.27 |
| T3 | 67.5±3.26 | 53.11 ^{bc} ± 5.31 | 49.41 ± 0.46 | 31.69 ^b ± 4.42 |

*Üst simgeler (a, b, ab ve bc) istatistiksel farkları göstermek için verilmiştir. Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05).

C: 0 µg E₂/mL eklenen kontrol grubu

T1: 2 µg E₂/mL eklenen test grubu-1

T2: 4 µg E₂/mL eklenen test grubu-2

T3: 8 µg E₂/mL eklenen test grubu-3

Tablo 2. İnkübasyon periyodunun 0., 4., 18. ve 24 saatlerinde kontrol ve test gruplarındaki akrozom taşımayan sperm sayıları (%) (ort ± o.s.h.).

| Gruplar | Akrozom taşımayan sperm sayıları (%) | | | |
|---------|--------------------------------------|--------------|--------------|----------------------------|
| | 0. Saat | 4. Saat | 18. Saat | 24. Saat |
| C | 7.52 ± 1.14 | 9.06 ± 0.94 | 8.88 ± 0.35 | 14.25 ^a ± 2.57 |
| T1 | 7.52 ± 1.14 | 7.64 ± 0.94 | 8.38 ± 0.30 | 10.51 ^b ± 1.85 |
| T2 | 7.52 ± 1.14 | 10.91 ± 0.83 | 10.84 ± 1.53 | 10.12 ^b ± 2.06 |
| T3 | 7.52 ± 1.14 | 10.02 ± 2.19 | 9.06 ± 1.16 | 11.43 ^{ab} ± 2.07 |

*Üst simgeler (a, b, ab) istatistiksel farkları göstermek için verilmiştir. Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05).

Louis, MO 63103, Missouri, ABD) 0.68 mL eklendi. Boya mavi solüsyonu, Kat; 1,09204, Merck, Darmstadt, Almanya)

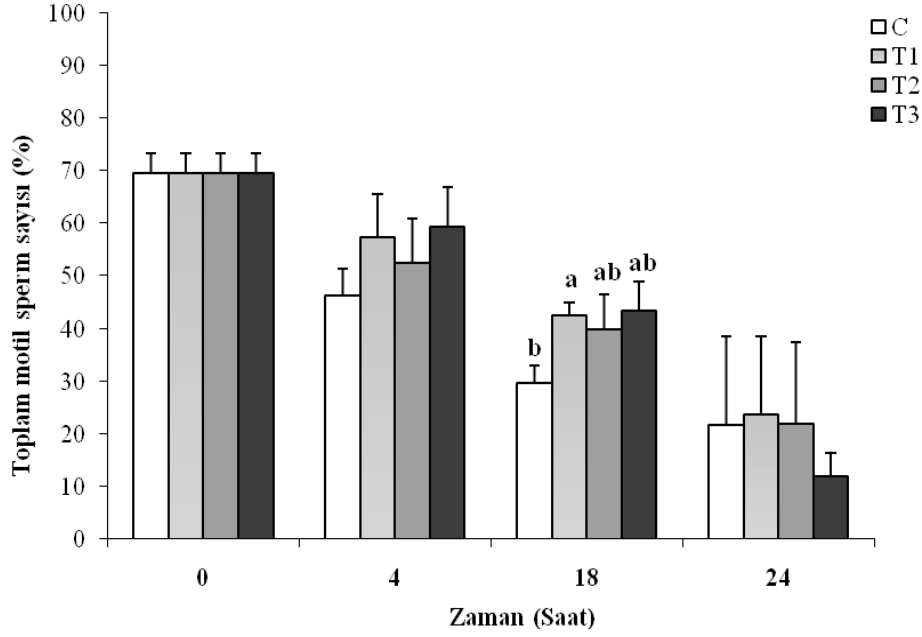
Tablo 3. Kültür periyodunun 0., 4., 18., ve 24. saatlerinde morfolojik anormallik taşıyan sperm sayıları (%) (ort. ±o.s.h.).

| Morfolojik Anormallikler | Gruplar | Zaman (Saat) | | | |
|------------------------------|---------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| | | 0 | 4 | 18 | 24 |
| Zarar görmüş akrozom | C | 5.36 ± 0.99 | 7.54 ± 1.42 | 6.74 ± 0.49 | 10.55 ± 1.40 |
| | T1 | 5.36 ± 0.99 | 6.26 ± 1.39 | 6.14 ± 0.62 | 12.41 ± 3.01 |
| | T2 | 5.36 ± 0.99 | 8.92 ± 1.10 | 7.19 ± 0.57 | 11.26 ± 2.91 |
| | T3 | 5.36 ± 0.99 | 9.08 ± 1.24 | 6.42 ± 0.34 | 9.56 ± 2.61 |
| Prokzimal stoplazmik çıkıntı | C | 2.35 ± 1.36 | 1.07 ± 0.34 | 0.65 ± 0.17 | 0.55 ± 0.23 |
| | T1 | 2.35 ± 1.36 | 1.53 ± 0.41 | 0.64 ± 0.33 | 0.44 ± 0.23 |
| | T2 | 2.35 ± 1.36 | 0.61 ± 0.29 | 0.50 ± 0.36 | 0.47 ± 0.32 |
| | T3 | 2.35 ± 1.36 | 0.61 ± 0.19 | 0.41 ± 0.10 | 0.50 ± 0.12 |
| Dıştal stoplazmik çıkıntı | C | 2.18 ± 0.50 | 2.13 ± 1.20 | 0.32 ± 0.22 | 0.63 ± 0.23 |
| | T1 | 2.18 ± 0.50 | 1.13 ± 0.52 | 0.89 ± 0.26 | 1.07 ± 0.76 |
| | T2 | 2.18 ± 0.50 | 1.58 ± 0.47 | 0.61 ± 0.30 | 1.12 ± 0.61 |
| | T3 | 2.18 ± 0.50 | 0.95 ± 0.32 | 0.39 ± 0.26 | 0.58 ± 0.18 |
| Kıvrık kuyruk | C | 1.86 ± 0.98 | 0.95 ± 0.37 | 1.79 ± 1.19 | 0.57 ± 0.25 |
| | T1 | 1.86 ± 0.98 | 0.62 ± 0.27 | 0.73 ± 0.34 | 0.38 ± 0.20 |
| | T2 | 1.86 ± 0.98 | 0.74 ± 0.25 | 1.41 ± 0.93 | 0.35 ± 0.20 |
| | T3 | 1.86 ± 0.98 | 0.71 ± 0.30 | 1.32 ± 0.82 | 0.31 ± 0.09 |

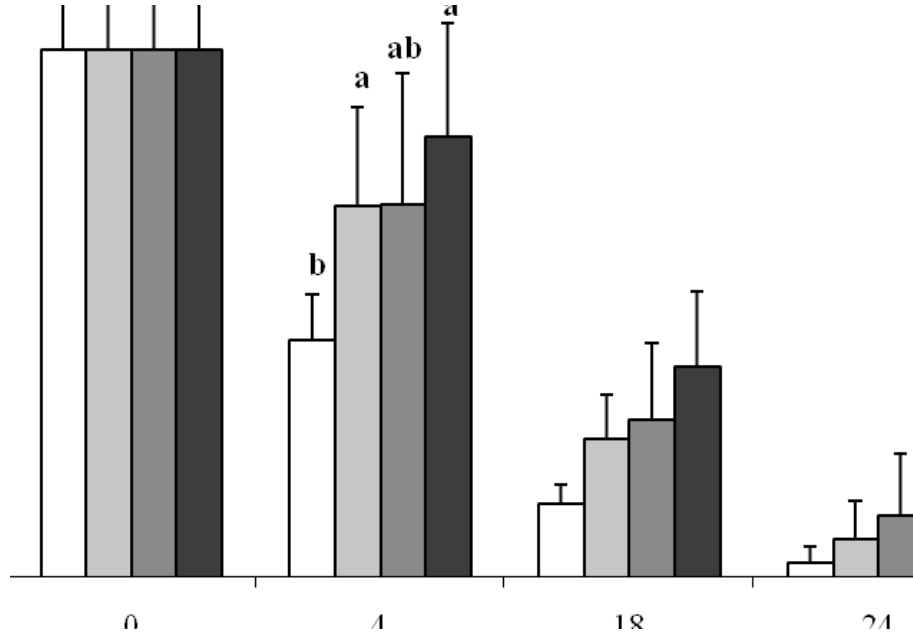
*Tablodaki farklı gruplara ait değerler istatistiksel olarak farklı bulunmadı (P> 0.05)

ışık geçirmeyen amber cam şişeye konuldu, şişe folyoyla sarıldı ve kullanılacak zamana kadar 4 °C de tutuldu. Nigrosin-Eosin (NE) ve giemsa boyasını hazırlamak için 900 µL NE boyasına 100 µL giemsa (Azur eosin metilen

eklenerek hazırlandı. Başlangıçta ve takip eden 4, 18, ve 24. saatlerde her petri kutusundan 100 µL semen örneği alınarak 2 ayrı test tüpü içersisine konuldu sonra üzerine eşit hacimde formaldehit (Kat: FI/01FS/060929, Kimetsan, Türkiye)



Figür 1.Estradiol-17 β (E₂) içeren (T1, T2, T3) veya içermeyen (C) kültür ortamında 24 saat boyunca, 18.5 °C'de toplam hareketli sperm oranları (%). C;kontrol grubu iken T1, T2 ve T3 sırasıyla 2 μ g, 4 μ g ve 8 μ g E₂ / mL içeren test grupları. İstatistiksel olarak farklı bulunan sonuçlar üst simgeler (a, b, ab) ile gösterilmiştir; farklı harf taşıyan değerler birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (P < 0.05).



Figür 2.Yirmi dört saat süreyle 18.5 °C'deki kültür ortamında tutulan spermelerden ileri hareket edenlerin oranı (%). Kültür ortamına 2 ve 8 μ g E₂/mL ilave edilmesi sonucu kültür periyodunun 4. saatinde ileri hareket eden sperm sayısı kontrol grubuna kıyasla önemli seviyede arttı (P < 0.05).

etlendi ve beş dakika süreyle 37 °C de fiksse edildi. Beş dakika sonra 1. tüpe daha önceden hazırlanan Nigrosin-Eosin (NE) boyasından 100 μ L ve eklendi ve 10 dakika 37 °C de boyamaya bırakıldı. Aynı şekilde 2. tüpe 37 °C'daha önceden hazırlanan NE-Giemsma (NEG) karışım boyasından 100 μ L (90 μ L NE ve 10 μ L Giemsa) eklendi ve 10 dakika 37 °C de boyamaya bırakıldı.

Motilite ve Morfolojik Anormalliklerin Tespiti

Her deneyin başlangıcında hareketli sperm sayıları Makler sayım çemberi (Sefi-Medical, Haifa, İsrail)

yardımıyla bulundu ve inkübasyonun 4., 18., ve 24. saatlerinde her petri kutusundan 2 μ L semen örneği alınarak 37 °C'ye kadar ısıtılmış Makler sayım çemberine konuldu ve 40-50 küçük karede sırasıyla duran, kimildayan, dairesel ve ileri hareket eden sperm sayıları ışık mikroskobu yardımıyla 20X magnifikasyonda bulundu. Her ölçüm iki ayrı kişi tarafından yapıldı ve her ölçümde en az 200 sperm sayıldı. Morfolojik anormallikler inkübasyon süresinin 0., 4., 18., ve 24. Saatlerinde her petri kutusundan 100 μ L semen örneği alınarak 2 ayrı test tüpü içerisine konuldu üzerine Nigrosin-Eosin (NE) boyasından 100 μ L eklendi ve 10 dakika 37 °C

de boyamaya bırakıldı. Diğer tüpe ise NE-Giemsa (NEG) karışım boyasından 100 µL (90 µL NE ve 10 µL Giemsa) eklendi sonra 10 dakika 37 °C de boyamaya bırakıldı. Her tüp için iki lam hazırlandı. Lamalar 100X magnifikasyonda yağ imersiyon objektifiyi yardımıyla bilgisayara bağlı kamera (Leica, DFC-280) entegre edilmiş ışık mikroskobu (Leica, DM 2500) kullanılarak morfolojik anormallik (Akrozom, baş, kuyruk anormallikleri ve stoplazmik çıkıntılar) taşıyan sperm sayılarını ayrı kişi tarafından her lam üzerinde 200-300 sperm sayılarak bulundu. Boyama neticesi dış ve iç akrozomal membranlar belirgin halde görülmüyordu.

Canlı-Ölü Sperm Sayılarının Bulunması

Kültür periyodunun 0., 4., 18. ve 24. saatlerinde canlı ve ölü sperm sayıları ışık mikroskobu (Leica, DM 2500) altında 100X magnifikasyonda her lam üzerinde 200-300 sperm hücreleri sayıldı. Ölü sperm hücreleri NE boyasını aldıkları için koyu renkli gözükürken canlı spermeler ise beyaz parlak renkli gözüküyordu.

İstatistik Analiz

Sperm sayıları varyans analiziyle (Random Blok Dizayn) analiz edildi. İki farklı grup arasındaki fark ise MSTAT-C (Versiyon 1.2., 1998; Michigan State University, East Lansing, MI 48824, ABD) istatistik programı kullanılarak son önemli fark (Least Significant Difference, LSD) metoduyla $p < 0.05$ olasılık seviyesinde analiz edildi.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

İnkübasyon süresince toplam hareketli sperm sayısı (Ortalama \pm s.h.) figür 1 de görülmektedir. Kültür ortamına 2 µg E_2 /mL ilavesi sonucu toplam motilite inkübasyon süresinin 18. saatinde kontrol grubuna kıyasla arttı ($P < 0.05$). Diğer zamanlarda kontrol ve test grupları arasında toplam motilite bakımından farklar önemli bulunmadı ($P > 0.05$). Kültür ortamına 2 ve 8 µg E_2 /mL ilave edilmesi sonucu kültür periyodunun 4. saatinde ileri hareket eden sperm sayısı kontrol grubuna kıyasla önemli seviyede yüksekti ($P < 0.05$) (Figür 2). Düşük dozda E_2 (2 ve 4 µg/mL) ilavesi sperm canlılığını etkilemedi fakat yüksek dozda E_2 (8 µg/mL) ilavesi inkübasyon periyodunun 4. ve 24 saatinde kontrol grubuna kıyasla sperm canlılığında azalmaya neden oldu ($P < 0.05$, Tablo 1). Kültür periyodunun 24. saatinde kontrol grubundaki akrozom taşımayan sperm sayısı önemli seviyede ($P < 0.05$) yüksekti (Tablo 2). Estradiol ilavesi prokzimal ve distal stoplazmik çıkıntı taşıyan sperm sayısını aynı zamanda kıvrık kuyruk taşıyan sperm sayısını etkilemedi (Tablo 3).

Kültür ortamına 2 µg E_2 /mL ilave edilmesi ileri ve toplam hareket eden sperm sayılarını sırasıyla inkübasyon süresinin 4. ve 18. saatlerinde kontrol grubuna kıyasla önemli seviyede artırdı ($P < 0.05$). Kültür ortamına 8 µg E_2 /mL ilave edilmesi hareket eden toplam sperm sayısını etkilemedi fakat kültür periyodunun 4. saatinde ileri hareket eden sperm sayısı kontrol grubuna kıyasla önemli seviyede yükseltti. Mevcut sonuçlar 2 ve 8 µg E_2 /mL ilavesinin hareket eden sperm oranını artırdığını gösteriyor. Bu çalışmada materyal boğa spermeydi ve çalışmamız *in vitro* ortamdaydı. Buna rağmen bizim elde ettiğimiz sonuçta yakın sonuçlar Jin v.d.[24] tarafından hamsterde *in vivo* ortamda yapılan çalışmadan elde edildi. Jin v.d.[24] E_2 'nin sperm motilitesine etkisini ya E_2 içeren silastik derialtı implantlar kullanarak ya da hamsteri E_2 'ye karşı aktif immünize ederek ölçtüler.

Çalışma sonucunda yüksek miktarda E_2 içeren silastik implantlarla hamstere 20 gün boyunca muamele etmenin sperm motilite parametrelerini kontrol grubuna kıyasla önemli derecede ($P < 0.05$) artırdığını bildirirken E_2 'ye karşı aktif immünizasyonun ise sperm motilite parametrelerini önemli derecede ($P < 0.05$) azalttığını rapor ettiler. Sonuç olarak E_2 'nin sperm motilitesini etkilediği kararına varıldılar. Kısaca sperm hücrelerine E_2 ile muamele ister *in vivo* ister *in vitro* ortamda olsun sperm motilitesini artırır.

Bu çalışmada canlı spermeler Nigrosin-Esosin boyalarını almayan ve ışık mikroskobu altında beyaz görünen spermeler olarak kabul edildi. Bu ölçüm aynı zamanda spermelerin membran bütünlüğünün göstergesidir. Kültür ortamına düşük dozda (2 ve 4 µg/mL) E_2 ilavesi sperm canlılığını etkilemedi fakat yüksek dozda (8 µg/mL) E_2 ilavesi inkübasyon periyodunun 4. ve 24 saatinde kontrol grubuna kıyasla sperm canlılığında azalmaya neden oldu. Bu sonuca yakın bir sonuç Lukoseviciute v.d.[25] tarafından bildirildi. Lukoseviciute v.d.[25] dondurulmuş boğa spermelerini çözdükten sonra 1 µg E_2 /mL ilave etmenin sperm canlılığına bir etkisinin olmadığını bildirdiler.

Bu çalışmada kültür periyodunun 24. saatinde kontrol grubuna kıyasla E_2 ilavesi akrozom taşımayan sperm sayısını azalttı ve bu azalma önemli ($P < 0.05$) bulundu. Buna yakın sonuçlar insanda da elde edildi^[26]. Rossato v.d.[26] insan spermelerine E_2 hormonu eklenerek 120 dakika kültüre aldılar. Kontrol grubuna kıyasla E_2 ilavesinin kayıp akrozom taşıyan sperm sayısı üzerine etkisi olmadığını hatta istatistiksel olarak önemli olmayan ($P > 0.05$) bir azalmaya neden olduğunu verilerle açıkladılar. Diğer taraftan Francavilla v.d. [27] insan spermelerinin E_2 ile birlikte inkübasyonu spermelerin hamster yumurtasına füzyonunu ve kayıp akrozom taşıyan sperm sayısını etkilemediğini bildirdiler. Bu çalışma boğa spermeleri üzerinde yapıldı ve sonuçlar biraz farklıdır zaten tamamen aynı olması beklenemez çünkü kullanılan materyal, uygulanan doz ve deney koşulları farklıdır. Başka bir çalışmada Adeoya-Osiguwa v.d. [20] *in vitro* ortamda E_2 'nin kapasiteleştirilmemiş fare spermelerinin akrozom reaksiyonuna etkisini araştırdı. Elde edilen sonuçlara göre E_2 'nin kapasiteleştirilmemiş fare spermelerinin akrozom reaksiyonunu önemli seviyede artırdığını bildirdiler. Buna yakın sonuç domuz spermeleri üzerinde yapılan çalışmadan elde edildi. Lukas v.d. [28] *in vitro* ortamda E_2 hormonunun kayıp akrozom taşıyan domuz spermeleri üzerine etkisini çalıştılar. Elde ettikleri sonuçlara göre farklı domuzlardan alınan spermelere E_2 ilavesi doza bağlı olarak akrozom taşımayan sperm sayısını artırdığını bildirdiler. Görüldüğü gibi E_2 hormonunun akrozom taşımayan sperm sayısına ve dölleme yeteneğine etkisi konusunda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında tutarsızlıklar vardır. Bu tutarsızlıklar hayvanı türünden, uygulanan hormonun yapısından, dozundan, uygulama şeklinden ve araştırmacıların yaptıkları hatalardan kaynaklanmaktadır.

Mevcut verilere dayanarak estradiol ilavesinin boğa spermelinin dölleme gücünü artırdığı ya da kısırılığa neden olduğu söylenemez. Zaten bunu söylemek için E_2 ilave edilen spermelerle olgun sığır oositlerini döllemeye bırakmak ve dölleme oranını tespit etmek gerekir. Bu nedenle bu konuda daha çok araştırma yapmaya gerek vardır.

KAYNAKLAR

[1] Lindner, 1976. Occurrence of anabolic agents in plants and their importance. Environmental Quality and Safety. Supplement. 5:151-158.

- [2] Park D, Huang T, Frishman WH. 2005. Phytoestrogens as cardioprotective agents. *Cardiology in Review*. 13:13-17.
- [3] Bhathena SJ, Velasquez MT. 2002. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 76:1191-1201.
- [4] Cassidy A. 2003. Potential risks and benefits of phytoestrogen-rich diets. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 73:120-126.
- [5] Ward WE, Thomson LU. 2001. Dietary estrogens of plant and fungal origin: Occurrence and exposure. In: *The Handbook of Environmental Chemistry* (ed. Metsler) Vol 3, part 1, pp 101-128. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [6] Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL. 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*. 22:2-12.
- [7] Bennetts HW, Underwood EJ. 1951. The oestrogenic effects of subterranean clover (*trifolium subterraneum*); uterine maintenance in the ovariectomised ewe on clover grazing. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. 29:249-253.
- [8] Kudláč VE, Chury J. 1968. Östrogene und antigonadotrope Substanzen in Pflanzen und der Einfluß derartiger Stoffe auf die Geschlechtsfunktionen der weiblichen Haustiere. *Reproduction in Domestic Animals*. 3: 133-141.
- [9] Baggett B, Engel LL, Balderas L, Lanman G. 1959. Conversion of C14-testosterone to C14-estrogenic steroids by endocrine tissues. *Endocrinology*. 64:600-8.
- [10] Rommerts FF, De Jong FH, Brinkmann AO, Van der Molen HJ. 1982. Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *Journal of Reproduction and Fertility*, 65:281-288.
- [11] Tsai-Morris CH, Aquilano DR, Dufau MI. 1985. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology*. 132:1396-1401.
- [12] Schulster M, Bernie AM, Ramasamy R. 2016. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian Journal of Andrology*. 18:435-440.
- [13] Schlegel PN. 2012. Aromatase inhibitors for male infertility. *Fertil and Sterility*. 98: 359-362.
- [14] Hess RA. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1:52.
- [15] Fietz D, Ratzemböck C, Hartmann K, Raabe O, Kliesch S, Weidner W, Klug J, Oliveira PF, Alves MG, Martins AD, Correia S, Bernardino RL, Silva J, Barros A, Sousa M, Cavaco JE, Socorro S. 2014. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in human seminiferous tubular cells. *General and Comparative Endocrinology*. 201:16-20.
- [16] Bernardino RL, Alves MG, Silva J, Barros A, Ferraz L, Sousa M, Sá R, Oliveira PF. 2016. Expression of Estrogen Receptors Alpha (ER- α), Beta (ER- β), and G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) in Testicular Tissue of Men with Klinefelter Syndrome. *Hormone and Metabolic Research* 48:413-415.
- [17] Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL. 1978. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 103:1860-1867.
- [18] Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 139:4252-4263.
- [19] Liu HY, Zhang CQ. 2008. Effects of daidzein on messenger ribonucleic acid expression of gonadotropin receptors in chicken ovarian follicles. *Poultry Science*. 87:541-545.
- [20] Adeoya-Osiguwa SA, Markoulaki S, Pocock V, Milligan SR, Fraser LR. 2003. 17 β -Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Human Reproduction*. 18:100-107.
- [21] Gill-Sharma MK, Dsouza S, Padwal V, Balasiner N, Aleem M, Parte P, Juneja HS. 2001. Antifertility effects of estradiol in adult male rats. *Journal of Endocrinological Investigation*. 24:598-607.
- [22] Hess RA, Bunick D, Lee K-H, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*. 390, 509-512.
- [23] Hunter RHF. 1988. Transport of gametes, selection of spermatozoa and gamete lifespan in the female tract. In: *The Fallopian Tubes, their Role in Fertility and Infertility*. (Ed. Hunter RHF), pp. 53-80. Springer Verlag, New York.
- [24] Jin W, Arai KY, Watanabe G, Suzuki AK, Takahashi S, Taya K. 2005. The stimulatory role of estrogen on sperm motility in the male golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Andrology*. 26:478-484.
- [25] Lukoseviciute K, Zilinskas H, Januskauskas A. 2005. The effect of oestradiol, progesterone and heparin on bovine spermatozoa function after thawing. *Reproduction in Domestic Animal*. 40: 100-107.
- [26] Rossato M, Ferigo M, Galeazzi C, Foresta C. 2005. Estradiol inhibits the effects of extracellular ATP in human sperm by a non genomic mechanism of action. *Purinergic Signalling*. 1:369-375.
- [27] Francavilla F, Romano R, Pandolfi C, Macerola B, Santucci R, Necozone S, Francavilla S. 2003. Evaluation of the effect of 17 α OH-progesterone and 17 β -oestradiol on human sperm ability to fuse with oocytes: comparison and possible interference with the effect of progesterone. *International Journal of Andrology*. 26:342-347.
- [28] Lukas D, Pavla D, Andriy D, Katerina D-H, Jana P. 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8:87.