

# Boğalarda Seminal Plazma Proteinlerinin Fertilité ve Kriyoprezervasyon Açısından Önemi

Beste Çil, Ergun Akçay

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 31.03.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 22.11.2017

**Özet:** Seminal plazma ejakülatın sıvı olan bölümüdür ve hayvan türlerine göre değişen çeşitli erkek aksesuar bezlerinin salgıladığı sıvılardan oluşmaktadır. Memelilerde, rete testis, epididimis, seminal vezikül, ampulla, prostat ve bulboüretal bezlerden köken alan salgılardan oluşmaktadır. Spermatozoa, seminal sıvı içerisinde çeşitli proteinler ile etkileşime girmektedir. Bu proteinlerden bazıları plazma membranının stabilizasyonu, motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, viyabilite, fertilizasyon, oosite spermatozoon penetrasyonu, fagositozun desteklenmesi için yararlı etki gösterirken, bazı proteinler ise sperma prezervasyonu sürecinde özellikle de kriyoprezervasyon işleminde zararlı etkiler göstermektedir. Bu derlemede boğaların seminal plazma proteinlerinin fertilité ve kriyoprezervasyon açısından önemini ortaya koyabilmek amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Boğa sperması, seminal plazma, kriyoprezervasyon, fertilité

## The Importance of Seminal Plasma Proteins in Bulls in Terms of Cryopreservation and Fertility

**Abstract:** Seminal plasma is the fluid part of the ejaculate and it consists of liquids secreted by various male accessory glands that vary according to animal species. In mammals, it is composed of secretions originating from the rete testis, epididymis, seminal vesicle, ampulla, prostate and bulbourethral glands. Spermatozoa interacts with various proteins in the seminal fluid. Some of these proteins have beneficial effects on stabilization of plasma membrane, motility, capacity, acrosome reaction, viability, fertilization, spermatozoon penetration to oocyte and phagocytosis, while some proteins have deleterious effects on semen preservation, especially during cryopreservation process. In this review, it was aimed to reveal the importance of bull seminal plasma proteins in terms of fertility and cryopreservation.

**Key Words:** Bull semen, seminal plasma, cryopreservation, fertility

## Giriş

Seminal plazmanın kompozisyonu; türe, ejakülasyonlar arasındaki süreye, mevsime, beslenmeye ve hayvan sağlığına göre değişim göstermekle birlikte çeşitli iyonlar; Sodyum (Na), Potasyum (K), Çinko (Zn), Kalsiyum (Ca), Magnezyum (Mg), Klor (Cl), Bakır (Cu), Demir (Fe), Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Nikel (Ni), Selenyum (Se), Fosfor (P), enerji substratları; fruktoz, sorbitol gliserofosfokolin, organik bileşikler; sitrik asit amino asitler, peptitler, düşük ve yüksek molekül ağırlıklı proteinler, lipidler, hormonlar ve sitokinlerden oluşmaktadır. Ek olarak amonyum, üre, ürik asit, kreatinin gibi nitrojenik bileşenler ile askorbik asit ve hipotaurin gibi, içerdiği doğal antioksidanlar ve diğer faydalı komponentler spermatozoanın fonksiyonları ve membran bütünlüğünü koruması için gereklidir [9,18].

Seminal plazma proteinlerinin bir bölümü kan plazmasından, diğer bir bölümü ise testis, epididimis, vaz deferens ve eklenti bezlerinden köken almaktadır [21].

## Kan Orjinli Seminal Plazma Proteinleri

Bu proteinler, seminal plazmada pH ve ozmotik basıncının düzenlenmesi, iyon, lipid ve hormon transportunda görev almaktadırlar [32]. Seminal plazmadaki kan orjinli çeşitli proteinler; Prealbumin, Albumin, Globulin, Transferrin,  $\alpha$ -Antitripsin,  $\beta$ -lipoprotein,  $\beta$ -glikoprotein, Orsomukoid, Kininojen, Peptit hormonlar, IgG, IgA ve IgM'dir.

## Eklenti Bezi Orjinli Seminal Plazma Proteinleri

### 1. BSP

Boğalarda seminal vezikül tarafından salgılanan, asidik özellikteki sığır seminal plazma proteinleri

(BSP), heparin ve jelatin bağlayıcı proteinler ailesine ait olup seminal sıvıdaki toplam protein içeriğinin %40-57'sini oluşturmaktadır [20,21]. Çeşitli kaynaklara göre sınıflandırılması değişmekle birlikte, boğalarda 4 farklı BSP proteini bulunmaktadır. Bunlar; BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 ve BSP-30 kDa (kilo Dalton) olarak adlandırılmaktadır [20]. Her dört protein de jelatin, heparin, apolipoprotein A-I, glikozaminoglikanlar, kolin fosfolipidler ve düşük dansiteli lipoproteinlere bağlanma gibi benzer biyokimyasal özelliklere sahiptir. BSP-A3 hariç bütün proteinler glikoprotein yapısındadır.

Bazı araştırmacılar, aynı aminoasit dizilimine sahip olduğu ancak sadece glikolizasyondaki değişiklik nedeniyle BSP-A1 ve BSP-A2 proteinlerini tek bir protein gibi adlandırmakta (BSP-A1/A2) ve ikisini birlikte PDC-109 (Protein N-terminalli aspartik asit D ve karboksi terminalli Sistin'e sahip 109 amino asitli protein) olarak isimlendirmektedir [21]. Manjunath ve ark [24], ise diğer hayvan türlerinde de benzer proteinlerinin bulunması ve karışıklık yaratmaması açısından BSP-A1/BSP-A2'nin BSP1, BSP-A3'ün BSP3 ve BSP-30kDa'nın ise BSP5 olarak isimlendirilmesini önermiştir ve bu proteinleri "Spermin bağlayıcı proteinleri" adı altında toplamaktadır [20].

Spermatozoa hareket yeteneğini epididimisten geçiş sırasında kazanmaktadır. Kauda epididim kısmında depolanırken durgun bir evreden geçmekte ve ejakülasyonu takiben motilite artarak fertilizasyon bölgesine transferleri sağlanmaktadır [33]. Ejakülasyon sırasında spermatozoa kısa bir süre seminal plazmayla karşılaşmakta ve bu süreçte BSP spermatozoon membranından %5-8 oranında kolesterol uzaklaştırmaktadır. Bir yandan da bu proteinler plazma membranındaki fosfolipidler fosforilkolin gruplarına bağlanarak membranı kaplamakta ve stabilize etmektedir. BSP-A1, BSP-A2 ve BSP-A3 spesifik olarak fosforilkolin gruplarına bağlanırken, BSP-30 kDa'un daha geniş bir bağlanma spesifitesi bulunmaktadır [18]. Olası bir erken akrozom reaksiyonunu engelleyen bu durum, spermatozoanın dişi genital kanaldaki yüksek dansiteli proteinler (HDL) ile karşılaşmasına kadar devam etmektedir [21]. Sperma, ovidukta ulaştığında spermatozoaya bağlanan proteinler, HDL ve heparin gibi kapasitasyon faktörleri ile etkileşime geçmekte ve olası kapasitasyonu, HDL ve heparinin memb-

randan kolesterol ve fosfolipid çıkarması ile başlatılmaktadır [20]. BSP, HDL ile kompleks oluşturmak için plazma membranından ayrılırken, aynı zamanda kolesterol ve belirli fosfolipidlerin de çıkışına neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak spermatozoon membranının permabilitesi, kolesterol/fosfolipid oranı değişimi nedeniyle bozulmakta ve fosfolipaz A2 enziminin aktivasyonu için içeri kalsiyumun girişi sağlamaktadır. Fosfolipaz A2, fosfolipidleri, membran destabilizasyona neden olan lizofosfolipidlere dönüştürmekte bu da akrozom reaksiyonunu başlatmaktadır. Bu nedenle membrana BSP proteinlerinin bağlanması dekapasitasyonu sağlarken, membrandan ayrılması ise kapasitasyonu tetiklemektedir [21].

Motilite ile ilişkili proteinlerin büyük bir kısmı flagellumun orta kısmında bulunmaktadır [33]. Özellikle seminal plazmada bol miktarda bulunan BSP1 proteinin, doza bağlı bir şekilde, büyük bir olasılıkla  $Ca^{+2}$  ATPaz aktivasyonu yolu ile motiliteyi arttırdığı ortaya konulmuştur [37].

Sulandırılmamış boğa ejakülatı, 37 °C'de 24 saat bekletildiğinde membranda % 40 oranında kolesterol ve % 40 oranında kolin fosfolipid kaybı gözlemlenmiştir [4]. Bunu kanıtlar nitelikte, düşük fertilite yeteneğine sahip boğa spermatozoonlarının plazma membranlarında yüksek konsantrasyonlarda BSP-A3 proteinleri saptanmıştır [36]. Fertilizasyondaki birçok aşamada katkılarının bulunması nedeniyle BSP proteinleri fertilitenin potansiyel bir işaretçisi olarak görülmekte ve özellikle kriyoprezervasyon işlemine hassasiyeti belirlemede rol oynamaktadır.

## 2. Lipokalin-Tip Prostaglandin D Sentez

Taşıyıcı proteinler familyasına ait olan fertilite ilişkili 26 kDa proteini, uyku induksiyonu, vücut ısısının düzenlenmesi, düz kas kontraksiyonu ve gevşemesinde rol almaktadır. Erkek üreme sistemindeki rolü tam olarak bilinmemesine rağmen spermatidlerde, Sertoli hücrelerinde, rete testiste, eferent kanal ve epididimal epitelyal hücrelerinde, akrozomun tepesi kısmı ve boğa ejakülatında bu proteine rastlanmıştır. Spermatozoanın gelişimi ve olgunlaşması aşamalarına katkı sağladığı düşünülmektedir. Kan testis ve kan epididimis bariyerlerinde transmembran lipofilik taşıyıcı protein olarak görev almaktadır [20]. Bu proteinin fazla miktarda sentezi Gerena ve

ark. ve Killian ve ark [12,19] tarafından yüksek fertilite ile ilişkilendirilirken, Moura ve ark. [29] tarafından düşük fertilite, Jobim ve ark. [17] tarafından ise dondurulabilirlik derecesi düşük spermatozoa ile ilişkilendirilmiştir.

### 3. Fosfolipaz A2 (Pla2)

Çoğu hücre ve dokuda bulunan 60 kDa moleküler ağırlığa sahip bu enzim, boğa ejakülatlarında plazma membranı, akrozom ve post-akrozomal madde de bulunmaktadır. Ejaküle olmuş spermatozoanın yüzeyinde bağlı bir şekilde bulunan bu enzim araşidonik asit sentezlemekte ve akrozom reaksiyonu ile ilişkilendirilen Prostaglandin E<sub>2</sub>'ye dönüştürülmektedir. Bu da spermatozoanın maturasyonunda, akrozom reaksiyonunda ve spermatozoon-oosit birleşiminde görev almaktadır. BSP konsantrasyonuna bağlı olarak, PLA2 aktivitesi stimüle ya da inhibe edilmektedir. BSP spermatozoa yüzeyinden kolin fosfolipidleri ayırarak PLA2'nin fosfolipidlerle olan etkileşimini engellemekte ve bu şekilde erken akrozom reaksiyonunun önüne geçilmektedir. Bunlara ek olarak PLA2'nin immun hücreleri stimüle ettiği ve seminal plazmada antimikrobiyal aktivitesi olduğu bildirilmiştir [20]. Yüksek fertiliteli boğaların eklenti bezlerinde daha fazla miktarda PLA2 sentezi gerçekleşmektedir [29].

### 4. Osteopontin (OPN)

Yüksek miktarda asidik ve 55 kDa moleküler ağırlığına sahip bir glikoprotein olan osteopontin (OPN), aspartik asit, glutamik asit ve serinden zengindir. Genel olarak hücre adezyonu, dokuların yeniden modellenmesi, immun hücre stimülasyonu, kemotaksis, kalsiyum oksalat kristalizasyonu inhibisyonu, hücreler arası haberleşme, hücre iskeleti dinamiği ve tümör metastazlarıyla ilişkilendirilmiştir. Bu protein hayvan türlerine göre değişmekle birlikte ampulla, seminal vezikül ve epididimisten sentezlenmektedir [8]. Seminifer tubüllerde sertoli ve germ hücreleri tarafından sentezlenmekte ve germ hücrelerini, tubüllerin taban membranına ve bitişik sertoli hücrelerine bağlamaktadır. Boğalarda seminifer tubüllerde sadece spermatid evresinde OPN sentezi gerçekleşmektedir. Kapasitasyonu desteklemekte ve apoptotik yolları engelleyerek spermatozoanın canlılığını artırmaktadır. Spermatozoa membranı ile etkileşime geçmekte, spermatozoon-oosit bağlanmasını ve erken embriyonik gelişimi

etkilemektedir. Ejakülasyon sırasında spermatozoaya bağlanmakta ve fertilizasyon bölgesine ulaşana kadar bağlı kalmaktadır. Eksojen OPN'in in vitro erken embriyonik gelişime pozitif etkisi bulunmuştur. Bunlara ek olarak, spermatozoonun oosite penetre olma yeteneği, sığır ve domuzlarda polisperminin engellenmesi ile ilişkilendirilmektedir. Bu protein yüksek fertiliteli boğaların seminal plazmasında, ortalama fertiliteye sahip boğalara göre 2-3 kat, düşük fertiliteli boğalara göre ise 4 kat daha fazla miktarda tespit edilmiştir [29].

### 5. Asidik Seminal Sıvı Proteini (aSFP)

Spermadhezin protein ailesine ait, 12-16 kDa moleküler ağırlığına sahip aSFP, ampulla ve seminal vezikül salgılarında saptanmıştır. Ejakülasyon sırasında spermatozoa yüzeyinde bulunan fosfatidietanolaminlere yapışarak spermatozoaya bağlanır. Çeşitli oligosakkaritlere, sülfat polisakkaritlere, serin proteaz inhibitörüne, glikozaminoglikanlara ve fosfolipidlere bağlanma yeteneğine sahiptir. Heparin'e de bağlanmakta ve kapasitasyon sırasında spermatozoon membranından ayrılmaktadır. Bu bağlanma eğilimleri nedeniyle boğalarda spermatozoanın kapasitasyonunda rol aldığı düşünülmektedir. Domuz spermadhezinlerinin aksine, boğalarda ejakülasyon sırasında spermatozoa yüzeyine gevşek bir şekilde bağlanmakta ve kapasitasyon sonrasında kaybolmaktadır [18]. Oositin çevresine ulaşana kadar spermatozoa yüzeyinden tamamen temizlendiği ve bu nedenle de dekapasitasyon faktörü gibi görev aldığı, Dostolova ve ark. [10] tarafından öne sürülmüştür. Bu nedenle domuz spermadhezinlerinin aksine, boğalarda aSFP, sperm-oosit etkileşiminde etkili değildir [28].

### 6. P25b

Ksilüloz redüktazlar ailesine ait olan P25b, epididimal epitelden salgılanmakta ve epididimal transport sırasında spermatozoa yüzeyine bağlanmaktadır. Akrozomal kapsülü örten plazma membranı ile ilişkilendirilmektedir. Epididimal maturasyonun işaretçisi olarak görülmektedir. Düşük fertiliteli hayvanlarda düşük seviyelerde saptanmıştır [20].

Dondurma sonrasında kısmen yüzeyden ayrılmakta ve bu kayıp spermanın dondurulabilirliğini düşürmektedir. Lessard ve ark. [22], süt bazlı sulandırıcıların, yumurta sarısı kullanılan sulandırıcılara

göre dondurma süreci ile ilişkili protein kaybına karşı daha etkili koruma sağladığını bildirmiştir. Bu nedenlerden dolayı P25b proteini dondurma işlemi sürecindeki fertilite kaybının da önemli bir işaretçisidir.

### 7. Spermadhezin Z13

Spermatozoanın yüzeyine bağlanmaktadır. Motilite üzerindeki olumsuz etkisi nedeniyle düşük fertiliteli boğalarda yüksek seviyelerde spermadhezin Z13 bulunmuştur [20] ve bu nedenden dolayı antifertilite faktörü olarak görülmektedir [19,29]. Z13 olarak isimlendirilen peptit için, Tedeschi ve ark. [41] tarafından yapılan çalışmada bu proteinin asidik seminal sıvı proteini ile %50 oranında ve seminal plazma motilite inhibitörü ile %43 oranında homolog olduğu belirlenmiştir.

### 8. Klusterin

Heparin bağlayan proteinler ailesindedir ve 75-80 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Kan, seminal plazma ve çeşitli solid dokularda bulunan bu protein germ hücreleri maturasyonunda spermatozoanın plazma membranına bağlanmaktadır. Lipid transportu, programlı hücre ölümü, salgı işlemleri gibi birçok farklı alanda görev almaktadır. Hücrenel debrisin temizlenmesi ve apoptozis ile ilişkilendirilmektedir. Sertoli hücreleri ve epididimal epitel hücreleri tarafından üretilerek anormal germ hücreleri ve spermatozoaya geçmektedir. Fizyolojik olarak, anormal spermatozoayı bağlamakta ve aglutine etmekte, oksidatif hasarı engellemektedir [28]. Kalitesi düşük olan spermalarda klusterin yüzdesi, spermatogenezis sürecindeki bir hatanın veya düzensiz epididimal maturasyonun önemli bir işaretçisidir, fertilite ile ters korelasyon göstermektedir.

### 9. Ubikuitin

İlk olarak sığır timusundan izole edilen 8.5 kDa molekül ağırlığına sahip bu protein daha sonra yapılan çalışmalarda bütün ökaryotik hücrelerde saptanmıştır. Hücre içi proteoliziste önemli rol oynamaktadır. Erkek genital kanalında epididimis tarafından salgılanmaktadır. Yüksek seviyelerdeki ubikuitin seviyeleri zayıf sperma kalitesi ve düşük fertiliteyi göstermektedir. Hatalı spermatozoa yüzeyine bağlandığı için anormal spermaların önemli bir işaretçisidir [20,32].

## 10. Diğer Seminal Plazma Proteinleri

### 10.1. İleri motilite proteini (FMP)

Isıya dayanaklı bir glikoprotein olan FMP, 37.5 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Spermatozoanın progresif motilite kapasitesinin önemli bir işaretçisidir. Tür spesifik değildir. Erkek infertilitesinin teşhisinde ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır [32].

### 10.2. Ig G – Fc bağlayan proteinleri

Isıya dayanaklı 94 kDa ağırlığına sahip bu protein ejakülasyon sonrası spermatozoa yüzeyine bağlanarak Ig G – Fc molekülünün spermatozoaya bağlanmasını sağlamaktadır. Spermatozoayı tohumlama sonrası dişilerde oluşan immün yanıtı karşı koruduğu düşünülmektedir [32].

### 10.3. Immobilin

Bu glikoprotein, 400 kDa molekül ağırlığına sahip olup, kaput epididimiste sentezlenerek tubüllerin lümenine salınmakta ve sperma ile birlikte kauda epididimise geçmektedir. Depo bölgesi olan kauda epididimiste yüksek miktarda viskoz-elastik bir ortam sağlayarak spermatozoonların hareketini engellemektedir [32].

### 10.4. Hücrenel retinol bağlayan proteinler

Retinolun sistematik transportunda görev almaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Sertoli hücrelerinin de bu proteini sentezleyip salgıladığı ortaya çıkarılmıştır [32].

### 10.5. Androjen bağlayıcı proteinler (ABP)

Testisin seminifer tubüllerindeki Sertoli hücreleri ve epididimis tarafından üretilen bu glikoprotein 70-90 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Spesifik olarak testosteron, dihidrotestosteron ve 17-beta-östradiol bağlanmaktadır. FSH'nın Sertoli hücrelerine olan etkisi altında regüle olan bu protein üretimi, insülin, retinol ve testosteron sentezine bağlı artmakta ve epididimal tubüllerde spermatozoa maturasyonu için uygun bir mikroçevre sağlamaktadır [32].

### 10.6. Seminal plazmin

Yüksek derecede antimikrobiyel etkili, 5.4 kDa molekül ağırlığına sahip (pI: 9.6-9.8) bu protein 48 adet aminoasit içermektedir. Kalsiyum transportunun önemli bir regülatörüdür. Zona pelusida ile indüklenmiş akrozom reaksiyonun pozitif modülatörüdür. [32].

### 10.7. Heparin Bağlayıcı Proteinler (HBP)

Seminal vezikül ve prostat bezlerinden salgılanan bu proteinler, 14-31 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Spermatozoanın akrozom reaksiyonu geçirmesine yardımcı olmaktadır [32].

### 10.8. Gossact

Isıya dayanıklıdır ve 16 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Pamuk tohumunda bulunan, sarı fenolik pigment olan gosipol anti-fertilite ajanı olarak görev yapmaktadır. Spermatozoada laktat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek mitokondriyal hasara ve akrozom fragmantasyonuna neden olmaktadır. Gossact proteini ile gosipolun etkileri inhibe edilmektedir [32].

### 10.9. İnterloklinler

İnterlökin 10 seviyesi ile motilite arasında önemli bir korelasyon saptanmıştır. İnterlökin 6 ve tümör nekroz faktörü arasında ters bir ilişki bulunmuş aynı zamanda, interlökin 10 ve interlökin 6 arasında da ters ilişki saptanmıştır [9].

### 10.10. Kalmodulin bağlayan proteinler

15 kDa moleküler ağırlığa sahip bu proteinler, seminal veziküllerden salgılanmaktadır. Akrozom reaksiyonunu tetikleyen iyonların bağlanarak girişini sağlamaktadır. Kalsiyuma bağlı enzim aktivitelerinin stimülasyonu için kalmodulini bağlamaktadırlar [32].

### 10.11. Sisteinden zengin salgı proteinleri

Kauda epididimiste yüksek konsantrasyonlarda bulunmakta, buradaki hücrelerden sentezlenerek lümeneye salınmakta ve epididimal sıvının protein içeriğinin %15'i kadarını oluşturmaktadır. Maturasyonun ileriki evrelerinde rol almaktadır [32].

### 10.12. Makrofaj göçü inhibisyon faktörü

Leydig hücreleri tarafından salgılanmakta ve Sertoli hücrelerinin inhibin üretimini modüle etmektedir. Epididimal geçiş sırasında spermatozoaya bağlanmaktadır [32].

### 10.13. Seminal protein 40

40 kDa molekül ağırlığında iki polipeptit zincirine sahip toplam 80 kDa moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir. Hücre lizisini önleyici etki göstermektedir [32].

### 10.14. Fertilizasyon ilişkili antijen (FAA)

Seminal vezikül ve prostat bezinden salgılanmaktadır. Heparin bağlayıcı proteinler ailesindedir. Spermatozoa membranına bağlanarak heparin-spermatozoa etkileşimlerini düzenlemektedir [31].

### 10.15. HBP homolog protein

24 kDa molekül ağırlığa sahip olan bu protein fertilite ile ilişkilendirilebilmektedir [32].

### 10.16. Non-Heparin bağlayan protein

Manda spermatozoasını kriyoprezervasyon stresine karşı korumaktadır. Ayrıca Heparin bağlayan proteinlerinin kriyoprezervasyon sürecindeki zararlı etkilerine karşı koruma sağlamaktadır [32].

### 10.17. Isı şoku proteini (HSP)

Boğa ve domuz spermasından ekstrakte edilen bu protein, hücreyi ısıdan ve kimyasallardan korumaktadır. HSC-70 ve HSP-70 olmak üzere iki temel izoformu bulunmaktadır. HSP-70 ısı stresine maruz kalan hücrelerde, normal hücrelere oranla daha fazla bulunmaktadır. Spermatozoanın zona pellusidaya adezyonu ve penetrasyonunda regülatör görevi görmektedir. Aynı zamanda sitoplazmik damlacığın atılmasında da görev almaktadır. Buna ek olarak çözümlü motiliteyi olumlu etkileyen nitrik oksidaz sentezini aktive etmektedir. Hem spermatositogenezis hem de spermiyogenezis aşamalarını regüle etmekte, spermatozoonları kriyoprezervasyon esnasında oksidatif strese karşı korumakta ve hücre içi protein dengesini sağlamaktadır [38].

### 10.18. DE (ARP)

37 kDa ağırlığına sahip olan bu glikoprotein, androjen seviyesine bağlı olarak epididimal epitelden sentezlenmekte ve salgılanmaktadır. Sperm-oosit füzyonunu etkilemektedir [32].

### 10.19. Fukoz bağlayan protein

Bu protein spermatozoanın ovidukt dokusuna bağlanmasını engellemektedir [32].

## Seminal Plazma Proteinlerinin Fertilitedeki Görevleri

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla seminal plazma proteinlerinin fertilite üzerinde çeşitli etkileri olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 1,2).

**Çizelge 1.** Bazı boğa seminal plazma komponentleri ve çeşitli görevleri [34].

Heparin bağlayan proteinler	Kapasitasyon
<b>Spermadheziner</b>	Uterusta immunostimülasyon
<b>aSFP Protein</b>	Motilite Spermatozoanın dişi genital kanalda oksidatif strese karşı korunması
<b>Glikosidazlar</b>	Motilite
<b>Egzopeptidazlar</b>	Motilite
<b>Fosfolipazlar</b>	Motilite
<b>Fosfolipaz A-2</b>	Akrozom reaksiyonu
<b>Heparin (Şeker)</b>	Kapasitasyon

**Çizelge 2.** Bazı proteinlerin fertilizasyon ile ilişkili görevleri [5].

Molekül	Bulunduğu yer	Fonksiyonu	Yazarlar
<b>Fertilite ile ilişkili proteinler (osteopontin, PGDsenteaz)</b>	Seminal plazma	Bilinmiyor	[6,7,12,19]
<b>Heparin bağlayıcı proteinler</b>	Eklenti bezi salgısı ve spermatozoa	Kapasitasyon	[2]
<b>Fertilite ile ilişkili antijen (FAA)</b>	Eklenti bezi salgısı ve spermatozoa	Kapasitasyon	[2,25,26,39]
<b>Klusterin</b>	Testis ve epididimal sıvı	Hatalı spermatogenezis ve epididimal maturasyonun işaretçisi	[11,15]
<b>Isı şoku proteini (Hsp2A)</b>	Spermatozoon kuyruk membranı	Olgunlaşmamış spermatozoa işaretçisi	[14,35]

Henault ve Killian [13] tarafından in vitro olarak gerçekleştirilen çalışmada yüksek fertiliteli boğalardan alınan seminal plazma, düşük fertiliteli boğaların spermatozoonlarına eklendiğinde oosit füzyonu artmış, tam tersi olarak düşük fertiliteli boğaların seminal plazmasının eklendiği yüksek fertiliteli boğaların spermatozoonlarında ise, bu oran düşmüştür. Devamında yapılan çalışmalarda ratlarda seminal plazmadan elde edilen bir peptid olan prosapozin'in çözüm sonu spermatozoaya eklendiğinde fertiliteyi % 29 oranında arttırdığı görülmüştür [1].

Killian ve ark. [19] lipokalin benzeri prostaglandin D sentez ve osteopontin proteinlerinin fertilitesi yüksek olan boğaların seminal plazmasında daha fazla miktarda bulunduğunu yaptığı çalışma ile ortaya koymuştur.

### Seminal Plazma Proteinleri İlavesinin Prezervasyona Etkisi

Sperma saklama işlemleri, plazmalemmmanın stabilite ve fonksiyonuna hasar vermekte, fertilizasyon yeteneğini düşürmektedir. Özellikle yüksek oran-

da sulandırılmış spermada, bağlı seminal plazma proteinlerinin ayrılmasına, plazma membranının bütünlüğü ve fonksiyonu için hayati önem taşıyan doğal antioksidanlar ve iyonların kaybına neden olmaktadır. Az miktarda seminal plazma veya serum albuminin (BSA) sulandırıcıya eklenmesi sayesinde bu istenmeyen etkilerin önüne geçilebilmektedir [27]. Soğuk şoku ile ilgili yapılan biyokimyasal çalışmalar, protein ve lipid kaybının spermatozoada morfolojik değişime neden olduğu özellikle de akrozomal ve plazma membran hasarına neden olduğunu göstermiştir. Türe bağlı olarak değişen bu etkiler insan, maymun ve tavşan spermalarının yüksek kolesterol/fosfolipid oranı ve doymuş yağ asidi içeriği nedeniyle soğuğa karşı daha dirençli olmasını sağlarken boğa, koç ve domuz gibi türlerde daha çok hasara neden olmaktadır. Doymamış yağ asitleri oranı spermatozoon membranının akışkanlığı ve permabilitesini etkilemekte ve belirli bir sıcaklıkta membran fosfolipidlerinde faz değişimine neden olmaktadır [30].

Seminal plazma proteinleri, prematür kapasiteye ve spontan akrozom reaksiyonuna kar-

şı stabilize edici etki göstermekte, buna ek olarak soğutmadan kaynaklanan hasarlardan ve kriyokapasitasyondan korumaktadır [8]. Seminal plazma proteinlerinin koruyucu ve tamir edici etkileri tür spesifiktir. Yapılan bir çalışmada BSP ve BSA'nın koç spermasına katılması membran bütünlüğü için herhangi bir olumlu etki göstermemiştir [18].

Boğa ve koçta seminal plazma, motilite ve viyabilitenin korunmasında, domuz spermasında ise soğuk şoku hasarına karşı direncin artışında önemli bir etkiye sahiptir [9].

Seminal plazma dondurma işlemi sırasında koruyucu bazı komponentler içermektedir ancak özellikle aygır spermasında santrifüj ile seminal plazmanın uzaklaştırılması ve yüksek oranda sulandırılma yapılması sonucunda kriyoprezervasyon için daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Motilite üzerinde ısıyla değişebilen protein substansları nedeniyle zararlı etki görülebileceği, ancak sulandırma ile bu etkilerin en aza indirilebileceği düşünülmektedir [9].

Boğalarda, asidik boğa seminal plazma proteini, klusterin, spots 3 ve spots 11 proteinleri yüksek dondurulabilirlik ile protein 25 ise düşük dondurulabilirlik ile ilişkilendirilmektedir [17,43]. Ancak Ibrahim ve ark. [15] tarafından yapılan bir çalışmada klusterin pozitif olan sperma ile dondurma öncesi ve dondurma sonrası motilite değerleri arasında ters bir ilişki bulunmuştur. Buna ek olarak, Jobim [16] tarafından, gerçekleştirilen bir çalışmada osteopontin de yüksek dondurulabilirlik özelliğine sahip spermatozoa ile ilişkilendirilmiştir.

Plazma membranındaki kolesterol içeriği düştüğünde, spermatozoanın soğuğa olan direncinin de düştüğü bilinmektedir. Konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak BSP proteinleri hem yararlı hem de zararlı etkiler göstermektedir [40]. Boğa spermasının dondurulması ile % 40-57 olan BSP miktarı % 4-6'ya düşmekte, bu da prematür kapasitasyonu indüklemektedir [27].

Manjunath ve ark. [23] yaptığı çalışmalarda sulandırıcılarda hücre dışı kriyoprotektan olarak kullanılan yumurta sarısının veya yine sulandırıcılara eklenen yağsız süt tozunun BSP proteinleri ile etkileşimini incelemiştir. Ejakülasyon sırasında spermatozoonlar seminal plazmada bulunan BSP proteinleri ile karşılaşmakta ve spermatozoon yüze-

yine bağlanarak membrandan kolestrol ve fosfolipid çıkışını başlatmaktadır. Membrandaki bu kayıp, spermatozoada hasara neden olarak spermanın soğuk şokuna karşı daha duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. Yumurta sarısında bulunan düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), BSP proteinlerinin büyük bir çoğunluğunu bağlayarak (1 LDL için yaklaşık 104±5 BSP ) membranda oluşabilecek değişimleri engellemekte, dolayısıyla viyabilite ve motilite değerleri korunmaktadır [33].

Benzer bir mekanizma ile yağsız süt tozu kullanılarak hazırlanan sulandırıcılardaki kazein miselleri ile BSP proteinleri etkileşime geçerek, (Kazein başına 4-5 BSP proteini) serbest BSP proteinlerinin spermatozoa yüzeyine bağlanarak, membrandan kolestrol ve fosfolipid çıkarmasını engellemektedir. Bütün BSP proteinleri kazein ile etkileşime geçebilmekle beraber BSP1 ve BSP5 aynı zamanda diğer süt proteinlerinden  $\alpha$  laktalbümin ve  $\beta$  laktoglobülin ile de etkileşime geçebilmektedir [33]. Ek olarak yumurta sarısı kullanılan sulandırıcılarda, BSP'nin, yumurta sarısının düşük dansiteli lipoprotein fraksiyonuna, hızlı, spesifik ve dondurma-çözdürme işlemi sonrasında bile stabil kalacak şekilde bağlanması, kriyoprezervasyon sürecindeki zararlı etkilere karşı koruyucu olabilmektedir [20]. Vishwanath ve ark. [42] bu etkinin, yumurta sarısındaki lipoproteinlerin, seminal plazmanın zararlı etki gösterebilecek katyonik peptitleri ile yarışarak spermatozoon membranına bağlanmasından kaynaklandığını göstermiştir.

Bunun yanı sıra süt kazeinlerinin de prezervasyon sürecinde BSP'nin zararlı etkilerini önlediği, Bergeron ve ark. [3] tarafından ortaya konulmuştur. Sütteki kazeinlerin, BSP'nin spermatozoaya bağlanmasını azalttığını ve bu şekilde spermatozoadaki lipid kaybını azaltarak, saklama sırasında spermatozoanın motilite ve canlılık değerlerini koruduğu gözlemlenmiştir.

## Sonuç

Spermatogenezis sonrası spermatozoa, oositi dölleme yeteneğine sahip değildir. Fertilizasyon yeteneği spermatozoanın erkek ve dişi genital kanalda transferi sırasında kazanılmaktadır. Bu transport sürecinde spermatozoa, seminal sıvı içerisinde çeşitli proteinler ile etkileşime girerek, motilite, oosit

bağlama, penetrasyon kapasitesi ve fertilizasyon yeteneği kazanmaktadır. Bu proteinler, spermatozoa membranının korunması için oksidatif stresin engellenmesinde, anti-mikrobiyal aktivite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve erken embriyonik gelişimde rol oynamaktadır.

Çeşitli seminal plazma proteinlerinin epididimal maturasyon ve ejakülasyon sırasında ilavesi veya çıkarılması çeşitli faktörleri etkilemektedir. Bazı proteinler plazma membranının stabilizasyonu, motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu viyabilite, fertilizasyon, oosite spermatozoa penetrasyonu ve fagositozun desteklenmesi için yararlı etki gösterirken, bazı proteinler ise sperma prezervasyonu sürecinde özellikle de kriyoprezervasyon işleminde zararlı etkiler göstermektedir. Ancak sulandırıcı hazırlanmasında kullanılan çeşitli komponentler ile bu etkinin önüne geçilebilmektedir.

## Kaynaklar

- Amann RP, Seidel GE, Brink ZA (1999): Exposure of thawed frozen bull sperm to a synthetic peptide before artificial insemination increases fertility. *J. Androl.*, 20: 42–46.
- Bellin ME, Hawkins HE, Ax RL (1994): Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J. Anim. Sci.*, 72: 2441–2448.
- Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P (2007): Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.*, 77: 120–126.
- Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, Manjunath P (2004): Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.*, 70: 708–717
- Braundmeier AG, Miller DJ (2001): Invited review: the search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *Journal of Dairy Science*, 84(9): 1915–1925.
- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ (1997): Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.*, 57: 1293–1301.
- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ (1999): Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol. Reprod.*, 60: 454–460.
- Chacur MGM (2012): Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Zebu Bulls (*Bos taurus indicus*). Chapter 10. In: *Electrophoresis*, Prof. Kiumars Ghowsi (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/45758.
- Çevik M, Tuncer PB (2005): Evcil Hayvanlarda Seminal Plazmanın Fiziko-Kimyasal Yapısı ve Üreme Fonksiyonları Üzerindeki Etkileri. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 45(2): 63–72.
- Dostolova Z, Calvete JJ, Sanz L, Hettel C, Riedel D, Schoneck C, Einspanier R, Topfer-Petersen E (1994): Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 375: 457–461.
- Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux J (2000): Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol. Reprod.*, 62: 1790–1803.
- Gerena RL, Irikura D, Urade Y, Eguchi N, Chapman DA, Killian GJ (1998): Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biology of Reproduction*, 58(3): 826–833.
- Henault MA, Killian GJ (1996): Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 108: 199–204.
- Huszar G, Vigue L, Morshedi M (1992): Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: A blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 57: 882–888.
- Ibrahim NM, Gilbert GR, Loseth KJ, Crabo BG (2000): Correlation Between Clusterin-Positive Spermatozoa Determined by Flow Cytometry in Bull Semen and Fertility. *Journal of Andrology*, 21(6): 887–894
- Jobim MM (2001): Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino. *Doktora Tezi. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS*
- Jobim MM, Oberst ER, Salbego G, Souza OD, Wald BY, Tramontina F, Mattos CR (2004): Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, 61: 255–266.
- Juyena NS, Stelletta C (2012): Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33(4): 536–551.
- Killian GJ, Chapman FA, Rogowski LA (1993): Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma. *Biology of Reproduction*, 49: 1202–1207.
- Kumar P, Kumar D, Singh I, Yadav PS (2012): Seminal Plasma Proteome: Promising Biomarkers for Bull Fertility. *Agric. Res.*, 1(1): 78–86.
- Kutty MYH, Remya V, Shyma VH, Radhika S, Shende AM, Bhure SK (2014): An overview on Binder of Sperm Proteins of Cattle. *International Journal of Livestock Research*, 4(4): 1–11.
- Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JK, Sullivan R (2000): Cryopreservation alters the level of a potential bull fertility marker. *J. Androl.*, 21:700–707
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J (2007): Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Spermatology*, 65: 217–228.
- Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW (2009): New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. *Biol. Reprod.*, 80(3): 394–397. DOI:10.1095/biolreprod.108.074088
- Mccauley TC, Zhang HM, Bellin ME, Ax RL (1999): Purification and characterization of fertility-associated antigen (FAA) in bovine seminal fluid. *Mol. Reprod. Dev.*, 54: 145–153.
- Mccauley TC, Zhang HM, Bellin ME, Ax RL (2001): Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Mol. Reprod. Dev.*, 58: 336–341.
- Mogielnicka-Brzozowska M, Kordan W (2011): Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(3): 489–499.
- Moura AA, Chapman AD, Koc H, Killian JG (2007): A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, 98: 169–188.
- Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ (2006): Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With



- Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach. *J Androl.*, 27: 201–211.
30. Muino-Blanco T, Perez-Pe R, Cebrian-Perez JA (2008): Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reprod. Dom. Anim.* 43(4): 18-31.
  31. Peddinti D, Nanduri B, Kaya A, Feugang MJ, Urgessc S, Memili E (2008): Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC systems Biology*, 2:19 DOI: 10.1186/1752-0509-2-19
  32. Perumal P (2012). Seminal Plasma Proteins. *Nature Proceedings*, DOI: 10.1038/npre.2012.7000.1
  33. Plante G, Prod'homme B, Fan J, Lafleur M, Manjunath P (2015): Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. *Cell Tissue Res*, 363(1):105-27. DOI 10.1007/s00441-015-2289-2
  34. Poiani A (2006). Complexity of seminal fluid: a review. *Behav. Ecol. Sociobol*, 60: 289-310.
  35. Rolf, C, Behre HM, Cooper TG, Koppers B, Nieschlag E (1998): Creatine kinase activity in human spermatozoa and seminal plasma lacks predictive value for male fertility in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 69: 727–734.
  36. Roncoletta M, Morani Eda S, Esper CR, Barnabe VH, Franceschini PH (2006): Fertility-associated proteins in Nellore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci*, 91:77–87
  37. Sanchez-Luengo S, Aumuller G, Albrecht M, Sen PC, Rohm K, Wilhelm B (2004): Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J Androl.*, 25: 234–44.
  38. Singh KA (2014): Influence of seminal plasma proteins in semen fertility. In: *Adoption of Newer Reproductive Techniques in Education, Diagnostics and Research* Ed: Ghuman SPS, Gandotra VK, Brar PS, Centre Of Advanced Faculty Training In Veterinary Gynecology And Reproduction, (Advanced Training Course, September 10-30, 2014).
  39. Sprott LR, Young J, Forrest DW, Zhang HM, Oyarzo JN, Bellin ME, Ax RL (2000): Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility associated antigen. *J. Anim. Sci.* 78: 795–798.
  40. Srivastava N, Jerome A, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A (2013): Bovine seminal PCD-109 protein: An overview of biochemical and functional properties. *Animal Reproduction Science*, 138: 1-13
  41. Tedeschi G, Oungre E, Mortarino M, Negri, A, Maffeo G, Ronchi S (2000): Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur. J. Biochem.*, 267: 6175–6179.
  42. Vishwanath R, Shannon P, Curson B (1992): Cationic extracts of egg yolk and their effect on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 29: 185–194.
  43. Yeomans GJ (2012): Breed differences in seminal plasma chemistry; implications for the cryopreservation of semen. *Doktora Tezi*. Texas Tech University, ABD