

Araştırma Makalesi

**HOROZLARDA SEMİNAL PLAZMA LİPİD PEROKSİDASYONU VE  
EKSTRASELÜLER ANTİOKSİDANLAR İLE BAZI SPERMATOLOJİK  
ÖZELLİKLER ARASINDAKİ İLİŞKİLER**

Pınar Alkım ULUTAŞ\*, İlker Serin\*\*, Ahmet CEYLAN\*\*

Geliş Tarihi : 28.07.2004  
Kabul Tarihi : 23.09.2004

**The relationship between seminal plasma lipid peroxidation and extracellular  
antioxidants with some spermatological features in cock semen.**

**Summary:** In this study, we aimed to determine the relationship between MDA levels in seminal plasma that indicates lipid peroxidation and sperm concentrations of extracellular antioxidants such as ceruloplasmin and uric acid, with rates of alive and dead spermatozoa and the spermatozoa morphology in cocks.

24 semen specimens were analysed in this study. These samples were obtained from ten cocks by cloacal stimulation within 15 days period. MDA, ceruloplasmin and uric acid levels was measured in seminal plasma and sperm concentration, rates of alive and dead spermatozoa and morphology in semen specimen. Results were investigated with basic correlation analyses. Statistically significant positive correlation ( $r=0,543$ ,  $p<0.05$ ) was determined between mean seminal plasma ceruloplasmin concentration with spermatozoon morphology; however no significant correlation between other parameters were determined.

**Key words:** Seminal plasma, MDA, ceruloplasmin, uric acid, cock.

**Özet:** Bu çalışmada horozlarda seminal plazmadaki lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA), ekstraseluler antioksidanlardan seruloplazmin ve ürik asit düzeyleri ile sperma

---

\* Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Işıklı, Aydın Tel: 0 256 2470700-173 e-mail: paulutas@adu.edu.tr

\*\* Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Röproduksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Işıklı, Aydın.

yoğunluğu, ölü-canlı spermatozoon oranı ve toplam anormal spermatozoon oranları arasındaki ilişkinin saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmada toplam 24 sperma örneği analiz edilmiştir. Bu örnekler 10 horozdan 3 gün arayla 3 kez kloakanın masajı yöntemi ile elde edilmiştir. Sperma örneklerinde yoğunluk, ölü ve canlı spermatozoon oranı ve toplam anormal spermatozoon oranı ile seminal plazmalarda MDA, seruloplazmin ve ürik asit düzeyleri belirlenmiştir. Sonuçlar basit korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Ortalama seminal plazma seruloplazmin konsantrasyonu ile toplam anormal spermatozoon oranı arasında istatistiksel açıdan önemli ( $r=0,543$ ,  $p<0.05$ ) pozitif korelasyon bulunurken diğer parametreler arasında istatistiksel önemde bir ilişkiye rastlanmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Seminal plazma, MDA, seruloplazmin, ürik asit, horoz

## Giriş

Hayvanlarda spermanın potansiyel fertilitésinin değerlendirilmesinde spermatozoon morfolojisi ve aktivitesi yanında, spermanın biyokimyasal olarak değerlendirilmesi de büyük önem taşımaktadır. Seminal plazmanın kimyasal bileşiminde saptanacak bir anormallik, erkek infertilitésinin belirlenmesinde değerli bir kriterdir (11).

Yaşamın devamlılığı için gerekli oksijenin metabolitleri olan reaktif oksijen türleri, hücre fonksiyonlarında bozukluklara neden olmaktadır (1). Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin artışına ve antioksidan koruma mekanizmasında azalmaya sebep olarak üreme fonksiyonunun bozulmasına yol açmaktadır (1,13). Padron ve ark. (19) infertil erkeklerin %25-40'ında semen örneklerinde reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerinden dolayı sperm kalitesini ve fonksiyonunu bozduğunu bildirmektedirler.

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan Malondialdehit (MDA) düzeyi hücre membranlarındaki lipidlerde oksidatif dejenerasyonun bir göstergesidir (16). Akut faz protein olan seruloplazmin, organizmada antioksidan olarak görev yapmaktadır. Seruloplazmin serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek, dokularda ve plazmada bulunan oksidanların zararlarını engellemektedir (7,10). Ürik asit, insan ve hayvan plazmasındaki en önemli suda çözünebilir antioksidandır. İnsan seminal plazmasında yüksek konsantrasyonda ürik asitin spermatozoonu serbest oksijen radikallerine karşı koruduğu bildirilmektedir (14).

Oksidatif stres ve infertilite arasındaki ilişki ile ilgili çalışmaların daha çok insanlarda yapıldığı gözlenmiştir (1-3,14,16,17). Kanatlılarda yapılan çeşitli çalışmalarda (8,22,23) seminal plazma lipid peroksidasyon düzeyleri incelenmiş ancak sperma kalitesi ve fonksiyonunun bir göstergesi olan toplam morfolojik bozukluk oranı ile oksidatif stres arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden bu çalışmada horozlarda seminal plazma MDA, seruloplazmin ve ürik asit düzeyleri ile bazı spermatolojik özellikler arasındaki ilişkiyi incelemek amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmada Nick Brown ırkı 1 yaşlı 10 horoz kullanılmıştır. Çalışma süresince horozlar Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kanatlı Ünitesinde altıklı bölmelerde barındırılmış, yem ve su ad libitum olarak verilmiştir. 3 gün aralıkla 3 kez kloakal masaj yöntemi ile 30 ejakulat toplanmış, 6 ejakulata kloakal içerik karıştığı için değerlendirilmeye alınmamıştır. Sperma örnekleri steril toplama kaplarına alınmış, her sağımda ortalama 0,4-0,6 ml ejakulat elde edilmiştir. Spermatolojik analizler için spermanın bir kısmı ayrılmış, kalan sperma örnekleri 5000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek seminal plazmaları elde edilmiştir. Seminal plazmada MDA analizi hemen yapılırken, seruloplazmin ve ürik asit analizleri için örnekler -20°C 'ye kaldırılmıştır.

Seminal plazma lipid peroksidasyonu Yoshiko ve ark.'nın (26) tanımladığı tiyobarbütirik asit (TBA) metodu ile ölçülmüştür. TBA ile MDA'nın reaksiyon ürününün absorbanı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) 535 nm'de ölçülmüştür.

Seminal plazma seruloplazmin düzeyi Sunderman ve Nomoto' nun (21) tanımladığı p-fenilendiamin oksidaz aktivitesi ölçümü metodu ile spektrofotometrik (Shimadzu UV-1601) olarak belirlenmiştir. Seminal plazma ürik asit düzeyi hazır ticari test kiti (Cromatest<sup>®</sup>, Linear Chemicals, Spain) ile prosedüründe belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Spermatozoon yoğunluğu hayem solusyonu ile 1/200 oranında sulandırılan sperma örneğinin Thoma lamında sayılması ile belirlenmiştir. Ölü spermatozoon oranı ile anormal spermatozoon oranının belirlenmesi için ise nigrosin-eosin boyaları kullanılarak basit boyama tekniği uygulanmıştır (24). Her preparatta 300 spermatozoon sayılmıştır.

Sonuçların istatistiki değerlendirilmesinde basit korelasyon analizi kullanılmıştır.

## Bulgular

Ortalama seminal plazma MDA, seruloplazmin, ürik asit konsantrasyonları ile ortalama spermatozoon yoğunluğu, ölü spermatozoon oranı, toplam anormal spermatozoon oranları ( $x \pm SD$ ) Tablo 1'de, seminal plazma MDA, seruloplazmin, ürik asit konsantrasyonları ile yoğunluk, ölü ve anormal spermatozoon oranları arasındaki korelasyonlar Tablo 2' de gösterilmiştir.

MDA ve ürik asit konsantrasyonları ile spermatolojik parametreler arasında korelasyon yapıldığında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon bulunamamıştır.

Seruloplazmin konsantrasyonu ile yoğunluk ve ölü spermatozoon sayısı arasında korelasyon bulunamazken, toplam anormal spermatozoon oranı arasında pozitif korelasyon ( $r=0,543$   $p<0.05$ ) belirlenmiştir.

Anormal spermatozoon oranı ile ölü spermatozoon oranı arasında da pozitif korelasyon ( $r=0,900$   $p<0.001$ ) saptanmıştır.



**Tablo1.** Horozlarda ortalama seminal plazma MDA, seruloplazmin, ürik asit konsantrasyonları ( $x\pm SD$ ) ile ortalama spermatozoon yoğunluğu, ölü spermatozoon oranı, toplam anormal spermatozoon oranları ( $x\pm SD$ ).

**Table 1.** Mean seminal plasma MDA, ceruloplasmin, uric acid concentrations ( $x\pm SD$ ) and mean spermatozoon density, rates of alive and dead spermatozoa and the spermatozoa morphology in cocks.

	MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	Seruloplazmin (mg/dl)	Ürik asit (mg/dl)	Spermatozoon Yoğunluğu ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	Ölü sp. Oranı (%)	Anor. sp oranı (%)
n=24	11,06 $\pm$ 3,06	12,92 $\pm$ 9,1	10,27 $\pm$ 4,79	1,06 $\times 10^4 \pm 0,63 \times 10^4$	6,61 $\pm$ 3,68	7,56 $\pm$ 4,55

**Tablo 2.** Horozlarda seminal plazma MDA, seruloplazmin, ürik asit konsantrasyonları, spermatozoon yoğunluğu, ölü sp.oranı ve anormal sp. oranı arasındaki korelasyon (r).

**Table 2.** The table of basic corelation in seminal plasma MDA, ceruloplasmin, uric acid concentrations and density, rates of alive and dead spermatozoa and the spermatozoa morphology in cocks (r).

	MDA	Ser	UA	Yoğ	Ölü	Anorm
MDA						
Ser	0,346					
UA	0,194	0,75				
Yoğ	-0,208	-0,153	-0,200			
Ölü	-0,10	0,266	-0,241	0,385		
Anorm	0,120	0,543*	0,107	0,367	0,900**	

\* :  $p < 0.05$

\*\* :  $p < 0.001$

MDA: Malondialdehit, Ser: Seruloplazmin, UA: Ürik asit, Yoğ: Yoğunluk, Ölü: Ölü ve canlı spermatozoon oranı, Anorm: Anormal spermatozoon oranı.

## Tartışma

Seminal oksidatif stresin erkekte infertilite ile birlikte görüldüğü pek çok çalışmada bildirilmektedir (1-3,14,16,17). Seminal oksidatif stres, spermada reaktif oksidasyon ürünlerinin oluşumu ile antioksidan koruyucu aktivite arasındaki dengeyi bozmaktadır. Artan seminal oksidatif stres sonucu ortaya çıkan, spermatozoon plazma membranındaki lipid peroksidasyonu; spermatozoon metabolizması, motilitesi ve fertilizasyon kapasitesini bozmaktadır (20). Bu çalışmada seminal plazma MDA düzeyleri ile spermatolojik özellikler arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Benzer

şekilde Nakamura ve ark. (16) yaptıkları çalışmada subfertil erkek hastalarda seminal plazma MDA seviyesi ile spermatolojik özellikler arasında bir ilişki bulamamışlardır. Ancak fertil gruba göre infertil hastalarda seminal plazma MDA düzeylerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada seminal plazma MDA düzeyleri ile spermatolojik özellikler arasında korelasyon belirlenememesi; spermatolojik özelliklerin (yoğunluk, ölü/canlı spermatozoon oranı ve anormal spermatozoon oranı) çeşitli kaynaklar (6,12) tarafından sağlıklı horozlarda bildirilen normal sınırların içerisinde olmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. İnfertil erkeklerde spermada reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması sonucu lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA düzeyinde artış olduğu bildirilmektedir (1,16). Ördeklere arsenik toksikasyonunun testikular dokuda MDA seviyesinde önemli oranda artışa ve sperma kalitesinde azalmaya neden olduğu rapor edilmektedir (8). Surai ve ark. (22) horozlarda diyetle ekledikleri Vitamin E ve selenyumun seminal plazma glutasyon peroksidaz aktivitesini arttırdığını ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağladığını bildirmişlerdir. Aksoy ve ark. (2) seminal plazma nitrik oksit seviyesi ile spermatozoon motilitesi arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir. Nitekim bu çalışmada da anormal spermatozoon oranı yüksek bulunan iki örnekte seminal plazma MDA düzeyinin diğer örneklerle göre yüksek olduğu bulunmuştur.

Ürik asit, suda çözünebilir en önemli antioksidanlardan biridir. Yapılan çalışmalarda insan seminal plazmasında yüksek düzeyde ürik asit konsantrasyonunun spermatozoonu serbest oksijen radikallerinin hasarından koruduğu bildirilmektedir (14). İnsan ve balık türlerinde yapılan çeşitli çalışmalarda seminal plazma ürik asit düzeyinin kan plazmasının ürik asit düzeyine yakın veya biraz düşük konsantrasyonda bulunduğu bildirilmiştir (9,15,25). Ancak horozlarda seminal plazma ürik asit düzeyine ait bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu çalışmada ortalama seminal plazma ürik asit düzeyi  $10,27 \pm 4,79$  mg/dl bulunmuş ve seminal plazma ürik asit konsantrasyonu ile spermatozoon özellikleri arasında bir korelasyona rastlanmamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda spermatolojik testlerinin oksidatif stresden etkilenmedikleri bildirilmesine rağmen (4,16), infertil erkeklerde spermada reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması sonucu seminal plazma antioksidan kapasitesinin azaldığı bilinmektedir (1,17,18). Bu çalışmada da anormal sperma sayısının yüksek olduğu belirlenen iki örnekte seminal plazma ürik asit konsantrasyonlarının düşük olduğu gözlenmiştir.

Bir akut faz proteini olan seruloplazmin organizmada antioksidan olarak görev yaparak serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu engellemektedir (7,10). Çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda enfeksiyon, travma ya da inflamasyonu takiben kan plazmasında düzeylerinin %50 oranına kadar arttığı bildirilmiştir (10). Yapılan literatür çalışmasında seminal plazma seruloplazmin konsantrasyonunu ile sperm özellikleri arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Blank ve ark. (5) prostatlı hastalarda spermada seruloplazmin düzeyini incelemişler ve hastaların %38'inde sperma seruloplazmin konsantrasyonunun arttığını; seruloplazmin düzeyini belirlemenin yangının göstergesi olarak kullanılabileceğini bildirirken; Orlando ve ark. (18), seminifer tubuler fonksiyonun

göstergesi olarak seminal plazma seruloplazmin ve transferrin konsantrasyonlarını inceledikleri bir çalışmada seruloplazmin düzeyinin seminfer tubuler hasarlı hastalarda normal sınırlar içinde olduğunu ancak seminal plazma transferrin konsantrasyonunun motilite ve spermatozoon sayısı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada toplam anormal spermatozoon sayısı ile seminal plazma seruloplazmin konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir ( $r= 0,543$   $p<0.05$ ). Bu durum Kruse ve ark. (13) bildirdiği sitokin sentezinin artışıyla ilişkili olarak karaciğerde seruloplazmin üretiminin artmasına bağlı olabileceğini akla getirmektedir.

Sonuç olarak, horozlarda, seminal plazma seruloplazmin konsantrasyonu ile toplam anormal spermatozoon oranı arasında pozitif korelasyon saptanmış, diğer parametreler arasında bir ilişki belirlenmemiştir. Horozlarda daha önce benzer bir çalışmanın yapılmamış olması göz önüne alınarak, yapılacak araştırmalara ön çalışma oluşturacağı ve elde edilen verilerin referans olarak kullanılabilmesi söylenebilir. Ayrıca bu çalışmanın çeşitli nedenlerle infertil olduğu belirlenen hayvanlarda ve farklı türlerde tekrarlanmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

### Kaynaklar

1. **Agervald, A., Ramadan A. S., Saleh, M.D., Bedaiwy M.A.** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 2002; 79 (4) 829-843.
2. **Aksoy, H., Aksoy, Y., Özbey I., Altuntaş, I, Akçay F.** The relationship between varicole and semen nitric oxide concentrations. *Urol Res*, 2000; 28:357-359.
3. **Aitken, R.J.Clarkson JS, Fishel S.** Generation of reactive oxygen species lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod*, 1989; 40: 183-197.
4. **Aitken, R.J., West, K.M.** Analyses of the relationship between reactive oxygene species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on percoll gradients. *Int J Androl*, 1990; 3:433-451.
5. **Blank, H., Hofstetter, A.** Complement C3, coeruloplasmin and PMN-elastase in the ejaculate in chronic prostato-adnexitis and their diagnostic value. *Infection*, 1991; 3: 138-140
6. **Busch,H.V., Löhle, K., Peter, W.** Künstliche Besamung bei Nutzicieren. 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag. Jena-Stuttgart 1991. Künsliche Besamung beim geflügel. 601-632
7. **Burtis, C.A., Ashwood, E.R.** Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3<sup>rd</sup> Edition. Chapter 20, 477-507. W.B. Saunders Company, 1999.
8. **Chaiching, L., ChiaChering, H., Mingcheng, C., Jengfang, H., Hungyi, C., Lin, C.C., Huang, C.C., Chen, M.C., Huang, J.F.A., Chiou, H.Y.** Arsenic toxicity on duck spermatozoa and the ameliorating effect of L- ascorbic acid. *Asian Australasian J Anim Sci*, 2002; 15(1): 19-25.



9. **Ciereszko, A., Dobrowski, K., Kucharczyk, D., Goryczko S., Glogowski, J.** The presence of uric acid, an antioksidantive substance, in fish seminal plasma. *Fish Physiol Biochem*, 1999; 21: 313-315.
10. **Gruys, E., Oblowo, M.J., Toussaint, J.M.** Diagnosis significanse of major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet Bull*, 1994; (64) 11: 1009 - 1015.
11. **Günay, Ü., Polat, Ü., Soylu, M.K., Kil, F.** Alman Çoban köpeklerinin seminal plazmasındaki bazı biyokimyasal parametrelerin saptanması. *Türk J Vet Sci*, 2003; 27: 983-986.
12. **Keskin, O., Tekin, N., Akçay, E.** Erbro ırkı horoz spermalarının farklı sulandırıcı ve kryoprotektanlarla dondurulması. *Lalahan hay Arş Ens Derg.* 1995; 35(3-4): 110-115
13. **Kruse, W.E., Boit, R., Rohr, G., Aufenanger, J., Hund, M., Strowitzki, T.** Relationship of seminal plasma interleukin-8 and IL-6 with semen quality. *Human Reprod*, 2001; 16 (3). 517- 528.
14. **Lewis, S.E.M., Sterling, E.S.L., Young, I.S., Thompson, W.** Comparison of indivual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile man. *Fertil. Steril*, 1997; 67: 142-147.
15. **Motchnik, P.A., Frei, B., Ames B.N.** Measurements of human antioxidants in human blood plasma. *Meth Enzymol*. 1992; 234: 249-252.
16. **Nakamura, H., Kimura, T., Nakajima, A., Shimoya, K., Takemura, M., Hashimoto, K., Isaka, S., Azuma, C., Koyoma, M., Murata, Y.** Detection of oxidative stres in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod*, 2002: 155-160.
17. **Omu, A.E., Al-Qattan, F., Al-Abdulhadi, F.M., Fatinikun, M.T., Fernandes, S.** Seminal immun response in fertile man with leukocytospermia : effect on antioxidant activity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod*, 1999; 86:195-202.
18. **Orlando, C., Caldini A.L., Barni, T., Wood, W.G., Strasburger, C.J., Natali, A., Maver, A., Forti, G., Serio, M.** Ceruloplasmin and transferin in human seminal plasma: are they an index of seminiferous tubuler function. *Fertil Steril*, 1985; 43 (2): 290-294.
19. **Padron, O.F., Brackett, N.I., Sharma R.K., Kohn, S., Lynne, C.M., Thomas, A.J.** Seminal reactive oxygene species, sperm motility and morphology in man with spinal cord injury. *Fertil steril*,1997; 67: 1115-1120
20. **Saleh, R.A., Agarwal, A., Nada, E.A., El-Tonsy, M.H., Sharma, R.K., Nelson D.R., Thomas, A.J.** Negative effect of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in man with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*, 2003; 79: 1597-1605.

21. **Sunderman, F.W., Nomoto, S.** Measurements of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clin Chem*, 1970; 16: 903-910.
22. **Surai, P., Kostjuk, I., Wishart, G., Macpherson, A., Speake, B., Noble, R., Ionov, I., Kutz, E.** Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biol Trace elements*, 1998; 64(1-3): 119-132.
23. **Surai P.E., Blesbois, E., Graseau, I., Cholah, T., Brillard J.P., Wishard, G.J., Cerolini, S., Sparks, N.H.C.** Fatty acid composition, glutathione peroxidase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comp Biochem physiol Part B*. 1998; 120: 527-533.
24. **Tekin, N.** Spermının muayenesi ve değerlendirilmesi. In: Evcil hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni tohumlama, doğum ve infertilite. Ed. Alaçam, E., Konya, 1994, 69-79.
25. **Xue, C., Yu, G., Hirata, T., Sakaguchi, M., Terao, J.** Antioxidative activity of carp blood plasma on lipid peroxidation. *Biosci Biotech Biochem*, 1998; 62: 201-205.
26. **Yoshoiko, T., Kawada, K., Shimada, T.** Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol*, 1979; 135: 372-376.