



Nitrate and Nitrite Levels in Serum and Seminal Plasma in Horses

Leyla MİS¹ Handan MERT² İnci DOĞAN SÖĞÜTLÜ³ Nihat MERT² Kıvanç İRAK⁴

¹ Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Van, Turkey

² Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Van, Turkey

³ Ministry of Agriculture and Forestry, Food and Control Directorate, Food Business and Codex Department, Ankara, Turkey

⁴ Siirt University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Siirt, Turkey

Received: 07.11.2018

Accepted: 23.11.2018

ABSTRACT

Nowadays, the fertility of the growing horses is of great importance. The aim of our study is to determine and compare the level of nitric oxide oxidation products of these animals in serum and seminal plasma. Seven healthy British horses were used in the study. Blood samples were taken from the vena jugularis. The sera were removed by centrifugation. Seminal plasmas of ejaculates taken with artificial vagina were separated. Seminal plasma and serum were obtained and nitrate and nitrite values were determined. Nitrate and nitrite levels of samples were measured by coupling reagent method. Nitrate levels in both serum and seminal plasma were 6.34 ± 2.7 and 4.95 ± 1.4 , respectively. Nitrite levels were higher than seminal plasma in seminal plasma ($p \leq 0.05$), while nitrite levels in seminal plasma were higher than serum ($p \leq 0.05$). As a result, seminal plasma and serum nitrate-nitrite values in British stallions were used. Presented to the knowledge of clinical veterinary medicine.

Keywords: Horse, Nitrate, Nitrite, Seminal plasma

ÖZ

Atlarda Serum ve Seminal Plazmada Nitrat ve Nitrit Düzeyleri

Günümüzde yetiştiriciliği giderek artan atların fertilitésinin önemi büyüktür. Çalışmamızın amacı, bu hayvanların serum ve seminal plazmada nitrik oksit oksidasyon ürünlerinin seviyesini belirleyip karşılaştırmaktır. Çalışmada 7 adet sağlıklı İngiliz atı kullanıldı. Kan örnekleri vena jugularisten usulüne uygun alındı. Santrifüj edilerek serumlar çıkarıldı. Suni vajen yardımı ile alınan ejakulatlarının seminal plazmaları ayrıldı. Seminal plazma ve serum elde edilerek nitrat nitrit değerleri belirlendi. Alınan örneklerde nitrat ve nitrit düzeyleri coupling reaktif ayırıcı yöntemi ile ölçüldü. Serum ve seminal plazmada Nitrat düzeyleri sırasıyla 6.34 ± 2.7 ve 4.95 ± 1.4 iken Nitrit 1.55 ± 0.7 ve 2.02 ± 0.45 olarak belirlendi. Serumda nitrat seminal plazmadan yüksek ($p \leq 0.05$) iken seminal plazmada nitrit düzeyi serumdan daha yüksek ($p \leq 0.05$) hesaplandı. Sonuç olarak İngiliz aygırlarında seminal plazma ve serum nitrat-nitrit değerleri kaliteli sperma hakkında fikir sahibi olmak için klinik veteriner hekimliğin bilgisine sunuldu.

Anahtar Kelimeler: At, Nitrat, Nitrit, Seminal plazma

GİRİŞ

Nitrik oksit, endotel kaynaklı gevşetici maddeler içinde önemli rolü vardır. Farklı kimyasal ve fiziksel uyarılara yanıt olarak endotel hücrelerden salınan lipofilik gazdır. Hücrelerde nitrik oksit sentaz enzimi arjinin ve oksijenden inorganik nitratın oksidasyonu ile NO ortama verilir (Guyton 2013). NO ortamda oksijen olduğu zaman süratli bir şekilde oksidasyona uğrayarak nitrat NO_2^- ve nitrit NO_3^- haline gelir (Brama1989).

Sperm hücresi oksijene ihtiyacı olan aerobik organizmadır. Bu nedenle oksidatif reaksiyonlara bolca maruz kalır ve mitokondri ROS üretiminin ana kaynağıdır (Koppers ve ark. 2008). Mitokondrilerinde ATP yokluğu spermada motilite kaybına neden olur. Ayrıca yaşayabilirlik ve

döllenme kapasitesi de azalır. Hasarlı veya olgunlaşmamış sperma ve semen lökositleri daha fazla ROS üreterek insan ve aygırda sperm disfonksiyonu şekillendirir (Aitken ve ark. 1994; Aitken ve ark. 2002). Fizyolojik olarak düşük düzeyde ROS fertil insanlarda normal sperma fonksiyonu ve boğalarda kapasitasyon işlemleri için gereksinilir (O'Flaherty ve ark. 1999). Hidrojen peroksit akrozom reaksiyonlar için gereklidir. Spermada DNA hasarı yüksek düzeyde spermadan üretilen ROS nedeniyle oluşur. Başında çok az sitoplazması bulunduğundan antioksidan ve DNA tamir sistemleri yoktur (Aitken ve ark. 1994; Gordon 2003; Sigman ve Zini 2009).

Ayır semeninde lipit, protein ve DNA değişmesi nedeniyle ROS hücreye hasar verir. Spermatozoa membran lipitlerinde fazla PUFA bulunması nedeniyle fazlaca ROS

üretimi oluşması bununda peroksidatif hasara duyarlı hale gelmesiyle olumsuz etkilenebilir. Yüksek miktardaki ROS aygır spermasında depolama sırasında yaşam süresini azaltıcı olarak görev yapar (Aurich 2005). Epididimis ve seminal plazma kompleks antioksidan sistemine sahip bir lipit protein ve DNA hasarını engelleyebilir.

Aygır caudal epididimal sıvısı ve seminal plazmanın ana enzimatik topalayıcısı katalazdır (Ball ve ark. 2000). Atlar spermatozoa'nın GPx ve SOD benzeri aktiviteleri sınırlı olmasına rağmen, seminal plazma yüksek SOD aktivitesine sahiptir (Baumber ve ark. 2005). Fertil aygırın seminal plazması, infertil olanlara göre daha düşük konsantrasyonda askorbik asit içerir. İlgili radikal türlerinden B-karoten, E vitamini ve indirgenmiş glutatyon gibi diğer antioksidan molekülleri rejenerere etmek için (Halliwell ve ark. 1996), atların soğutulmuş sperm membran bütünlüğünü korunmalıdır (Aurich ve ark.1997). At sütü saklanması sırasında sperm sağ kalımını iyileştirmek için seminal plazmanın kısmi çıkarılması gerekir (Morrell ve ark. 2014). Semen işlenmesi sırasında kısmi seminal plazmanın çıkarılması oksidatif stres topalayıcılarının çıkarılmasıyla sonuçlanmakta ve spermatozoayı aşırı reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine maruz bırakmaktadır (Ball 2008).

Aygırlarda seminal plazma çinko eksikliği sadece testis gelişimini ve spermatogenezi etkilemekle kalmaz ve aynı zamanda donma sırasında spermlerin korunmasında da rol oynar (Çigakova ve ark.1998; Barrier ve ark. 2002). Gaz durumunda ve çok kısa yarı ömürlü olarak bulunması nedeniyle nitrik oksidin ölçülmesi zordur. Bununla birlikte, nitrik oksid üretiminin belirteci olarak kullanılabilen nitrik oksidin son oksidasyon ürünü olan nitrit ve nitrat biyolojik sıvılarda kolaylıkla ölçülebilir (Moshage 1995).

Bu çalışmada atların serum ve seminal plazmada nitrat-nitrit düzeyleri belirlenerek karşılaştırmak amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada; Karacabey Tarım İşletmesinde bulunan 7 adet sağlıklı İngiliz aygırı kullanıldı. Kan örnekleri vena jugularisten usulüne uygun alındı. Santrifüj edilerek serumlar çıkarıldı. Suni vajen yardımı ile alınan ejakulatlarının seminal plazmaları ayrıldı. Seminal plazma elde etmek için, toplanan semen hemen 10 dakika boyunca 1000 x g'de santrifüj edildi. Prosedür sperm içermeyen seminal plazmayı garantilemek için ilk santrifüjlemenin süpernatantı ile tekrarlandı ve analiz edilene kadar -20°C'de saklandı.

Alınan örneklerde nitrat nitrit düzeyleri coupling reaktif ayırıcı yöntemi ile ölçüldü (Stahr 1977).

İstatistiksel analiz

Üzerinde çalışılan her bir parametre bakımından bağımsız iki grup ortalamaları arasındaki farkın önemliliğini test etmek için T-Testi kullanıldı. Veriler, aritmetik ortalama±standart sapma ($X \pm SX$), değer olarak verildi. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanıldı.

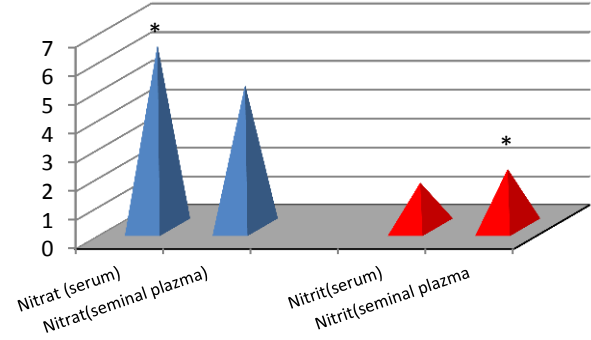
BULGULAR

Çalışmaya ait sonuçlar grafik olarak verilmiştir. Şekil 1 ve Tablo 1 de gösterilmiştir. Nitrat serumda nitrit düzeyleri ise seminal plazmada daha yüksek olarak bulundu.

Tablo 1. İngiliz aygırlarında serum ve seminal plazma nitrat-nitrit düzeyleri (n: 7)

Table 1. Serum and seminal plasma nitrate-nitrite levels in British stallions (n : 7)

	Serum	Seminal plazma	P
Nitrat(mg/L)	6.34±2.7	4.95±1.4	(P≤ 0.05)
Nitrit(mg/L)	1.55±0.7	2.02±0.45	(P≤ 0.05)



Şekil 1. İngiliz aygırlarında serum ve seminal plazma nitrat-nitrit düzeyleri (n: 7)

Figure 1. Serum and seminal plasma nitrate-nitrite levels in British stallions (n: 7)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Seminal plazma ejakülataın önemli bir parçasıdır ve sperm fonksiyonel aktivitesi, metabolizması, hayatta kalma ve dişi üreme yolu ile taşınmasında rol oynar. Bununla birlikte, equin seminal plazmanın sperm motilitesi üzerindeki zararlı etkisi hala tartışmalıdır (Pickett ve ark. 1975; Braun ve ark. 1994). Ayrıca, dondurulmuş çözülmüş semen motilitesindeki azalma, seminal plazma kriyoprezervasyondan önce tam olarak çıkarılmadığında fark edilmiştir (Nishikawa 1987). Eser elementlerin, antioksidan durumunun ve oksidatif stresin değerlendirilmesi, atlarda geleneksel semen değerlendirmesine destek olabilir.

Nitrik oksit nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arginin'den sentezlenir. Kurucu NOS'un endotelial veya eNOS ve nöral / beyin veya bNOS iki izoformu olmuştur. Her iki enzim de benzersiz genler tarafından kodlanır (Sessa ve ark. 1993), kalsiyum / kalmodulin bağımlı ve mevcut bazal koşullar (Moncada ve ark.1991) altında bu izoformlar olabilir. Dolaylı immünohistokimya kullanılarak tespit edilebilir. Nitrik oksit sentaz epididimde, vas deferens'te ve sıçanın koagülasyon bezi gösterilmiştir (Channess ve ark.1995)

Nitrik oksit hem dişi hem erkek reproduktif fonksiyonlarda ve hücre savunma, hücre bilgi taşıma gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli rol oynar (Pourova 2010).

Düşük seviyelerde NO, sperm fonksiyonu için önemlidir ancak fizyolojik konsantrasyonları aşan seviyelerde ise sperm fonksiyonunun bozulması ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Fizyolojik düzeylerde, sperm hareketlerinin devamlılığı, akrozomal reaksiyon aktivitesini ve spermde antiapoptotik etki oluşturur (Roessner ve ark. 2010).

Bazı çalışmalarda, yükselen NO düzeyinin artan sperm toksisitesine bağlı olarak motilite azalması olduğu bildirilmiştir (Roselli ve ark. 1995).

Memeli sperm fizyolojisinde NO'nun kesin rolü çelişkili görünmektedir; Düşük NO seviyeleri yararlıdır, yüksek NO seviyeleri ise zararlı görünmektedir. Spermatozoa ayrıca sperm motilitesi, kapasitans ve fertilizasyon için çok önemli olan NO üretimini de üretebilir. Stallionda, NO üretimi ile erime sonrası sperm motilitesi ve hızı arasındaki pozitif korelasyon, kriyoprezervasyon sırasında sperm fonksiyonunun sürdürülmesinde hayati bir rol olduğunu düşündürmektedir. NO'nun, zona bağlanması için hem motiliteyi hem de sperm yeterliliğini inhibe eden normal sperm fonksiyonları üzerinde zararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (Goud ve ark. 2008).

Birkaç çalışma NO konsantrasyonunun manipülasyonunu ve sperm fonksiyonu üzerindeki etkisini incelemiştir. Nitrik oksit donörleri genel sperm kalitesini arttırdığı gösterilmiştir (Leal ve ark. 2009). Sodyum nitroprusürün, erime sonrası sperm hareketliliğini iyileştirdiği (Hellstrom ve ark. 1994), motilite ve canlılığı iyileştirdiği (Zhang ve Zheng 1996), sperm membran oksidatif hasarı (Hellstrom ve ark.1994; Zhang ve Zheng 1996), inhibe ettiği ve hem normal hem de astenozoospermik semen örneklerinde hücre içi cGMP'yi artırdığı belirtilmiştir (Zhang ve Zheng 1996). Nitrik oksit donörlerinin de fare spermindeki akrozom reaksiyonunu doğrudan simüle ettiği gösterilmiştir (Herrero ve ark. 1997). Diğer hayvan modellerinde NO sentezinin inhibisyonu sperm motilitesini azaltır ve kapasitansın geç evresinde hiperaktivasyonu azaltır (Yeoman ve ark.1998) ve akrozom reaksiyonunu inhibe eder (Viggiano ve ark.1996).

Tıbbi literatürdeki mevcut kanıtlar, NO dahil, ROS'un sperm fonksiyonunda önemli olduğunu göstermektedir ve NO varlığında, konsantrasyonun sperm motilitesi üzerindeki etkilerini belirlediği görülmektedir (Roselli ve ark.1998) . Çalışmalar NO'nun hem pozitif hem de negatif etkilerini sperm fonksiyonunda göstermiştir, ancak NO konsantrasyonu ve NO'ya maruz kalma derecesi arasında net bir bağlantı sağlayamamıştır (De Lamirande ve ark.1997; Ford 2004). NO, sperm fizyolojisinde sperm hareketliliğinin ve kapasitelerinin düzenlenmesinde yer almasıyla önemli rol oynar (Hellstrom ve ark. 1994).

Nitrik oksidin(NO) düşük konsantrasyonu, fare, hamster ve insanda spermatozon motilitesinin arttırdığı belirtilmiştir (Yeoman 1998). Başka bir çalışmada; fare, insan, boğalarda akrozomal reaktivasyonun arttığı, insan spermatozonlarının hareket yeteneğinin arttığı rapor edilmiştir (Helstrom 1994; Sengoku 1998). Seminal plazma nitrit konsantrasyonu sperm konsantrasyon, sperm motilitesi, lökositopermi veya sperm kültürü ile korelasyon bulunmamıştır (Alberto ve ark. 2001).

Memelilerde metabolik aracı olarak keşfedilen nitrik oksit hızla gelişen bir araştırma alanı olmuştur. Nitrik oksit düz kas gevşemesinde (Palmer ve ark. 1987), vazodilatasyon (Calver ve ark.1993), bağışıklık düzenlenmesi (Nathan ve Hibbs 1991) ve nörotransmisyon olaylarında rol oynar. Nitrik oksit serbest radikaldır ama Spermatozoada hasar oluşturan lipid peroksidasyonunu şekillendiren süperoksit anyonlarını inaktif hale getirir, hatta üretimini engeller. Nitrik oksit özellikle antioksidanlar tarafından korunarak faydalı bir işleve sahiptir (Vallance ve Collier 1994).

Yapılan bir çalışmada seminal plazmada serum indirgenmiş glutatyon ve MDA ve NO konsantrasyonları anlamlı olarak yüksek bulunduğu, ancak dolaşımdaki GHD ve MDA üzerinde yaşın anlamlı bir etkisinin olmadığı ve seminal plazmada konsantrasyonlarını etkileme eğilimi gösterdiği belirtilmiştir (Gamal ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda da farklı olarak nitrat nitrit düzeyleri

serumda seminal plazmaya göre daha yüksek bulunmuştur.

At seminal plazması esas olarak prostatik sekresyonlardan elde edilen yüksek katalaz aktivitesini içerir. Seminal plazmanın semenden çıkarılmasını sağlayan semen kriyoprezervasyonu gibi prosedürler H₂O₂'yi süpürme yeteneğini azaltabilir ve böylece spermatozoanın oksidatif strese duyarlılığını arttırabilir (Ball ve ark. 2000). GSH, canlı hücrelerde yaygın olarak dağıtılmış bir tri-peptiddir. Oksidatif stresin doğrudan ve GSH peroksidazın kofaktörünün zararlı etkisinden hücre korumada önemli bir rol oynar (Atmaca 2004). Kriyoprezervasyon genişleticisinde GSH'nin dahil edilmesi çeşitli türlerde değişken sonuçlar vermiştir (Anel- Lopez 2012; Camara 2011). Peroksidasyon indükleyicilerin yokluğunda, taze sperm hücrelerinde sadece nispeten az miktarda peroksidasyon gözlenirken, Kafa zarı kaybına yol açan sperm başına ilerleyen donmuş çözülmüş sperm hücreleri için bazı orta parça peroksidasyona dikkat çekilmiştir (Neild ve ark. 2005).

Vücut sıvılarındaki çinko ve bakır, reaktif oksijen türlerine karşı hücre korumasında yer alır. Seminal plazma çinko ve bakırın anormal konsantrasyonları insan infertilitesi ile ilişkilidir. Bakır, ROS'un sperm fonksiyonu üzerindeki zararlı etkilerini şiddetlendirir (Aitken ve ark 2010). Bakır konsantrasyonunun normal değerlere göre artması, spermatozoa üzerinde, oksidatif süreçleri ve hareketliliği ve canlılığı azaltabilecek glikolizi azaltarak toksik etki yaratır (Cevk ve ark. 2007). Seminal plazma, kan serumundan 6 kat daha yüksek çinko içerir ve eski aygırların gelişmiş semen parametreleri sadece kan serumundaki yüksek seviyesini değil, aynı zamanda seminal plazmada da geçerlidir. Aygırların seminal plazmasında (Barrier ve ark. 2002) ve domuzu (Telisman ve ark. 2000) daha yüksek çinko konsantrasyonları da bildirilmiştir. Kan serumu çinko ve seminal plazma çinko ile anlamlı olarak ilişkili olduğu gibi, kan serumu çinko, bakır konsantrasyonu ve aygır semen kalitesi arasında da korelasyon saptanmamıştır (Danek ve ark. 1999). Seminal plazma çinko konsantrasyonu, sperm yoğunluğu veya motilitesi ile ilişkili değildir (Aboushakra ve ark. 1989). Çinko ve semen hacmi ile sperm konsantrasyonu arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır (Pesch ve ark.2006). Koçlarda, çinko ve sperm motilitesi yüzdesi ile sperm konsantrasyonu arasında anlamlı derecede pozitif bir korelasyon gösterilmiştir (Mahsud ve ark.2013).

Aygır seminal plazma bakır konsantrasyonunda önemli bireysel varyasyonlar da bildirilmiştir (Barrier ve ark. 2002). Seminal plazmanın bakır seviyeleri ile aygırdaki sperma değişkenleri arasında korelasyon yoktur (Pesch ve ark.2006). Kan serumu içinde çinko ve bakır konsantrasyonundaki yaşa bağlı farklılıklar bulunmuştur (Danek ve ark.1999). Kandaki çinko ve bakır konsantrasyonları ve aygır meni, bireysel aygırlar, diyet rejimindeki değişiklikler ve çevresel durumla, aygır çağı ile olan ilişkilerinden daha fazla olabilir. Koçlarda bakır, sperm motilitesi %, sperm konsantrasyonu ve spermatozoa anormallikleri arasında anlamlı negatif korelasyon vardır (Mahsud ve ark.2013).

Nitrik oksit (NO) miktar ve bulunma süresine bağlı olarak fertilité üzerinde farklı etkileri bulunmaktadır. Atlar ise ekonomik olarak gittikçe büyük bir öneme sahip olmaktadır. At yetiştiriciliğinin önemine bağlı olarak fertilité üzerinde hassasiyetle durulması gereken bir konudur. Her parametrenin detaylı incelenmesi gerektiğini önemle belirtmek gerekmektedir. Nitrik oksit belirteci olan nitrat nitrit ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç

olduğu görülmektedir. Çalışmamız, bu hayvanlarda çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde artış azalabilen nitrat ve nitrit düzeylerini hem serumda hem de seminal plazmada değerlerini belirleyerek literatüre katkı sağlayabilecek, ileride yapılacak çalışmalara fikir oluşturabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abou-Shakra FR, Ward NI, Everard DM (1989).** The role of trace element in male infertility. *Fertil Steril*, 1989, 52, 307-310.
- Aitken J, Fisher H (1994).** Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16,259-267.
- Aitken RJ, Marshall GJ (2002).** Human spermatozoa: the future of sex. *Nature*, 415, 963.
- Aitken RJ, De Luliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan R (2010).** Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod*, 25, 2415-2426.
- Alberto Revelli MD, Loredana BergandiD, Marco Massobrio MD, Bo Lindblom D, Amalia Bosia MD, Dario Ghigo MD (2001).** The concentration of nitrite in seminal plasma does not correlate with sperm concentration, sperm motility, leukocytospermia, or sperm culture. *Fertility and Sterility*, 76 (3), 496-500.
- Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H, Aurich C (1997).** Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, 48,185-192.
- Ball BA, Gravance CG, Medina V, Baumber J, Liu IK (2000).** Catalase activity in equine semen. *Am J Vet Res*, 61,1026-1030.
- Ball BA (2008).** Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impact on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci*, 107,257-267.
- Barrier-Battut, Dellajarraud H, Legrand E, Bruyas J-F, Fiéni F, Tainturier D (2002).** Calcium, magnesium, copper, and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. *Theriogenology*, 58, 229-232.
- Baumber J, Ball BA (2005).** Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. *Am J Vet Res*, 66, 1415-1419.
- Brama RS, Hendrix SA (1989).** Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem*, 61,2715-2718.
- Braun J, Torres-Boggino F, Hochi S, Oguri N (1994).** Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5°C. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 101, 301-304.
- Calver A, Collier J, Vallance P (1993).** Nitric oxide and cardiovascular control. *Experimental Physiology*, 78,303-326.
- Cevk M, Tuncer PB, Tafidemr U, Ozurtafi T (2007).** Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. *Turk J Vet Anim Sci*, 31, 381-387.
- Channes SL, Ricker DD, Crone JK, Dembeck CL, Maguire MR, Burnet AL, Chang TS (1995).** The effect of androgen on nitric oxide synthase in the male reproductive tract of the rat. *Fertil Steril*, 63,1101-1107.
- Cigankova V, Mesaros P, Bires J, Ledecy V, Ciganek J, Tomajkova E (1998).** The morphological structure of the testis in stallions with zinc deficiency. *Slovak Vet J*, 23, 97-100.
- Danek J, Wisniewski E, Krumrych W (1999).** The dependence between concentrations of zinc, copper, and calcium in blood serum and the characteristics of stallion semen. *Med Weter*, 55, 259-264.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C (1997).** Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, 2, 48-54.
- AM, Martinez HR (2009).** Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, 81, 1106-1111.
- Ford W (2004).** Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 10, 387-399.
- Gamal A, SisyAmal M, Abo El-MaatyZaher, M.Rawash (2016).** Comparative blood and seminal plasma oxidant/antioxidant status of Arab stallions with different ages and their relation to semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2016, 5,428-433.
- Gordon I (2003).** Capacitating bovine sperm. In: Laboratory production of cattle embryos. 2nd ed. Gordon I, CABI Publishing, CAB International, 158-175.
- Goud PT, Goud AP, Diamond MP, Gonik MP (2008).** Abu Soud H. Nitric oxide extends the oocyte temporal window for optimal fertilization. *Free Radic Biol Med*, 45, 453-459.
- Guyton ve Hall (2013).** Tıbbi Fizyoloji. Nobel Matbaacılık, İstanbul.
- Halliwell B (1996).** Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo. *Free Radic Res*, 25, 439-454.
- Hellstrom WJ, Bell M, Wang R, Sikka SC (1994).** Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertil Steril*, 61,1117-1122.
- Herrero MB, Viggiano JM, Perez Martinez S, De Gimeno MF (1997).** Evidence that nitric oxide synthase is involved in progesterone induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 9, 433-439.
- Leal AC, Caldas-Bussiere MC, Carvalho CS, Viana KS, Quirino CR (2009).** Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced in vitro capacitation. *Anim Reprod Sci*, 116,38-49.
- Koppers AJ, De Luliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aiteken RJ (2008).** Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, 93, 3199-3207.
- Mahsud T, Jamil H, Qureshi ZI, Asi MN, Lodhi LA, Waqas MS (2013).** Semen quality parameters and selected bio-chemical constituents level in plasma of Lohi rams. *Small Ruminant Res*, 113, 175-178.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991).** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43,109-42.
- Morrell JM, Georgakas A, Lundeheim N, Nash D, Davies Morel MCG, Johannisson A (2014).** Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. *Theriogenology*, 82,176-183.
- Moshage H, Kok B, Huizenge JR, Jansen PLM (1995).** Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*, 41,892-896.
- Nathan CF, Hibbs JB (1991).** Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*, 3, 65-70.
- O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT (1999).** Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology*, 52, 289-301.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987).** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 11-17,327,524-526.
- Pesch S, Bergmann M, Bostedt H (2006).** Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology*, 66, 307-313.
- Pickett BW, Sullivan JJ, Byers WW, Pace MM, Remmenga EE (1975).** Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil Steril*, 26,167-174.
- Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M (2010).** Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol*, 198, 15-35.
- Roessner C, Paasch U, Glander HJ, Grunewald S (2010).** Activity of nitric oxide synthase in mature and immature human spermatozoa. *Andrologia*, 42, 132-137.
- Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ (1995).** Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum Reprod*, 10, 1786-1790.
- Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK (1998).** Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod*, 4, 3-24.
- Sengoku K, Tamate K, Yoshida T, Takaoka Y, Miyamoto T, Ishikawa M (1998).** Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 69,522-527.
- Sessa WC, Harrison JK, Luthin DR, Pollock JS, Lynch KR (1993).** Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase. *Hypertension*, 21, 934-938.
- Sigman M, Zini A (2009).** Semen analysis and sperm function assays: what do they mean? *Semin Reprod Med*, 27, 115-123.
- Stahr HM (1977).** Analytical Toxicology Methods Manual. Iowa State University Press Ames, Iowa, USA, 68-71.
- Strowitzki T (2002).** Are zinc levels in seminal plasma associated with seminal leukocytes and other determinants of semen quality. *Fertil Steril*, 2, 260-269.
- Viggiano JM, Herrero MB, Martinez SP, De Gimeno MF (1996).** Analysis of the effect of nitric oxide synthase inhibition on mouse sperm employing a modified staining method for assessment of the acrosome reaction. *J Androl*, 17, 692-698.
- Vallance P, Collier J (1994).** Biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ*, 309 (6952) 453-457.
- Yeoman RR, Jones WD, Rizk BM (1998).** Evidence for nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation. *J Androl*, 19, 58-64.
- Zhang H, Zheng RL (1996).** Possible role of nitric oxide on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm function. *Free Rad Res*, 25, 347-354.