



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Koç spermasının ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik ve biyokimyasal parametreleri üzerine lipoik asitin etkisi

Nuri Başpınar¹, Kenan Çoyan², Mustafa Numan Bucak², Ali Doğan Ömür², Mehmet Bozkurt Ataman², Pınar Peker Akalın³, Şükrü Güngör², Caner Öztürk²

Özet

Başpınar N, Çoyan K, Bucak MN, Ömür AD, Ataman MB, Akalın PP, Güngör Ş, Öztürk C. Koç spermasının ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik ve biyokimyasal parametreleri üzerine lipoik asitin etkisi. **Eurasian J Vet Sci, 2011, 27, 2, 87-92**

Amaç: Koç sperması sulandırıcısına katılan farklı dozlardaki lipoik asitin spermanın ekilibrasyon ve dondurma sonrası bazı spermatolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada 6 baş ergin Konya Merinosu koçlara ait ejakülatlar kullanıldı. Ejakülatlar 4 eşit hacme bölünerek lipoik asit 1, 2, 4 mM içeren ve içermeyen (kontrol) Tris sulandırıcısıyla mL'de yaklaşık 400 x 10⁶ spermatozoa olacak şekilde 37 °C'ta sulandırıldı ve donduruldu.

Bulgular: Ekilibrasyon sonrası lipoik asitin kontrol gruplarına göre sperm parametrelerinde etkisi görülmezken, dondurma-çözdürme sonrası numunelerde lipoik asit 1 mM (%74.3), kontrol (%62.5) ve lipoik asit 4 mM (%65.0) gruplarına göre motilite yönünden önemli derecede iyileştirme sağladı (p<0.001). Spermatozoanın HOS test ve akrozom bütünlüğü üzerinde dondurma-çözdürme sonrası lipoik asitin etkinliği görülmedi. Lipoik asitin 1, 2 ve 4 mM dozlarının ekilibrasyon ve dondurma sonrası biyokimyasal parametreler yönünden kontrol gruplarına göre etkinlikleri önemli bulunmadı (p>0.05).

Öneri: Koç spermasına 1mM dozda lipoik asit ilavesi dondurma-çözdürme sonrası motiliteyi arttırmaktadır. Bununla birlikte lipoik asitin farklı sulandırıcılarda ve hayvan türleri-ırklarında doz denemelerinin yapılması gerekmektedir.

Abstract

Baspınar N, Coyan K, Bucak MN, Omur AD, Ataman MB, Akalın PP, Gungor S, Ozturk C. Effect of lipoic acid on spermatological and biochemical parameters following equilibration and freeze-thawing of ram semen. **Eurasian J Vet Sci, 2011, 27, 2, 87-92**

Aim: The aim of this study was to investigate the effects of different doses of lipoic acid added into dilution extender, following equilibration and freeze-thawing of ram semen on spermatologic and biochemical parameters.

Materials and Methods: The ejaculates collected from 6 mature Konya Merino rams were used in the research. Ejaculates containing approximately 400x10⁶ spermatozoa were diluted at 37 °C with the Tris-based extender containing lipoic acid at the doses of 1, 2, 4 mM and no additive (control), and then, they were frozen.

Results: After equilibration, all doses of lipoic acid did not affect the sperm parameters whereas lipoic acid 1 mM (74.3%) ameliorated motility compared to both control (62.5%) and lipoic acid 4 mM (65.0%) (p<0.001) groups after freeze-thawing. Lipoic acid did not affect HOS test and acrosome integrity of spermatozoa following freeze-thawing. Also, the supplementation of lipoic acid at 1, 2 and 4 mM doses did not provide any significant effect on the levels of biochemical parameters (p>0.05).

Conclusion: Addition of 1 mM lipoic acid to ram semen increases the motility after freeze-thawing process. However, dose treatments of lipoic acid in different extenders and animal species-breeds are required to be performed.

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ²Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 42075, Kampüs, Konya, ³Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara, Türkiye
Geliş: 29.11.2010, Kabul: 07.01.2011
*kcoyan@selcuk.edu.tr

Anahtar kelimeler: Koç sperması, dondurma-çözdürme, lipoik asit
Keywords: Ram semen, freezing-thawing, lipoic acid

► Giriş

Hayvan üreme biyoteknolojisinde spermanın dondurulması, suni tohumlama yoluyla dişi hayvanların gebe bırakılması önemli yer tutmaktadır. Bu bakımdan suni tohumlamanın entansif küçükbaş hayvan üretimi ve yetiştiriciliğinde önemli yere sahip olmasının yanında, elde edilecek başarıda spermanın dondurulmasında önem kazanmıştır. Ancak, dondurulmuş spermayla yapılan servikal tohumlamalarda taze spermaya kıyasla düşük fertilitite oranları elde edilmektedir. Fertilizasyondaki bu başarısızlığın önemli nedenleri arasında spermanın dondurulması sırasında gelişen soğuk şoku ve lipid peroksidasyon (LPO)'a bağlı hasarlar gösterilmektedir (Maxwell ve Watson 1996).

Kryobiyoloji hücre, doku, organ ve organizmaların dondurulmasını inceleyen bilim dalı olarak önemi artırmış ve dondurulan-çözdürülen ilk hücre spermatozoon olmuştur. Spermanın dondurulması-çözdürülmesi esnasında oluşan ısı şoku membran lipid faz değişimine, ozmotik-mekanik strese ve ortamdaki serbest radikallere bağlı olarak gelişen LPO membran proteinlerinin denaturasyonuna, hücre organellerinde yapısal deformasyona, DNA'da kırılmalara ve hücresel lizise yol açmaktadır. Bu hasarlar sonucu, spermatozoada ciddi ölçüde canlılık ve motilite kayıpları oluşmaktadır. Bu olumsuz etkiler sperma sulandırıcılarına antioksidanların ilavesiyle azaltılabilmekte, çözüm sonucu spermatozoa fonksiyonları iyileştirilmektedir (Polge ve ark 1949, Maxwell ve Watson 1996, Leibo ve Brandley 1999, Holt 2000, Watson 2000).

Lipoik asitin ratlarda oral kullanımının oksidatif streşi ve DNA hasarlarını engelleyerek spermatozoon fonksiyonlarında iyileşmeye yol açtığı bildirilmektedir (Selvakumar ve ark 2006). Ayrıca lipoik asit, kriyoprotektif özelliğiyle transplantasyon öncesi soğuk zincirde dokuların taşınmasında da kullanılmaktadır (Terry ve ark 2005).

Bu çalışmada, koç spermaları sulandırıcısına katılan lipoik asitin spermanın ekilibrasyon ve dondurma sonrası bazı spermatolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

► Gereç ve Yöntem

• Spermaların alınması, sulandırılması ve dondurulması

Araştırmada 6 baş ergin Konya Merinosu koçlara ait ejakülatlar kullanıldı. Araştırma prosedürü S. Ü. Veteriner Fakültesi Etik Kurulunca onaylandı. Koçların bakım ve beslemesi Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Uygulama ve Araştırma Çiftliğinde yapıldı. Ejakülatlar aşım sezonu içinde haftada 3 kez suni vajen yardımıyla alındı. Sperma alma işlemi on tekerrar üzerinde yapıldı. Alınan ejakülatlardan %80'in üzerinde motiliteye sahip olanlar miks yapılarak 37

°C'teki su banyosuna aktarıldı. Spermaların sulandırılmasında temel sulandırıcı olarak Tris sulandırıcısı (297.58 mM tris, 82.66 mM fruktoz, 96.32 mM sitrik asit, %15 yumurta sarısı, %6 gliserol; pH:7) kullanıldı. Miks yapılan ejakülatlar 4 eşit hacme bölünerek lipoik asit 1, 2, 4 mM içeren ve içermeyen (kontrol) Tris sulandırıcısıyla mL'de yaklaşık 400 x 10⁶ spermatozoa olacak şekilde 37 °C'ta sulandırıldı. Sulandırma işlemi takiben sperma numuneleri 0.25 mL'lik payetlere çekilerek +5 °C'ta 2.5 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyonu izleyen süreçte sperma numuneleri sıvı azot buharında (~-100 °C) dondurularak -196 °C'teki sıvı azotta saklandı. Spermalara ait ekilibrasyon sonucu en az 24 saat sıvı azotta bekletilen numuneler 37 °C'ta 20 saniyede çözdürülerek spermatolojik (motilite, hipoozmotik şişme testi ve akrozom bütünlüğü) ve biyokimyasal parametreler (LPO, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz) yönünden değerlendirildi.

• Spermatozoa motilitesi

Spermatozoa motilitesi 37 °C'ta ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskopun 200x büyütmesinde lam-lamel arasına alınan sperma numunesinde en az 3 farklı mikroskop sahasına bakılarak yapıldı. Sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması % motilite oranı olarak kaydedildi.

• Spermatozoanın hipoozmotik şişme testi (HOS test)

Spermatozoa plazma membranı fonksiyonel bütünlüğünün belirlenmesi için HOS test uygulandı. HOS test, 100 mOsm değerine sahip hipoozmotik sıvısından 100 µL'sinin 10 µL sperma numunesiyle karıştırılarak 37 °C'ta 30 dk bekletilmesiyle yapıldı. Bu karışımdan yapılan frotide faz-kontrast mikroskopun 400x büyütmesinde toplam 200 spermatozoa sayıldı. Bu hücrelerden kıvrılmış kuyruğa sahip olanlar % olarak ifade edildi.

• Spermatozoa akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi

Spermatozoa akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi için Nagy ve ark. dan modifiye edilmiş FITC-PNA/PI (Fluorescein isothiocyanate conjugated to Arachis hypogaea/Propidium iodide) floresan boyaması uygulandı. Bunun için 37 °C'taki 60 µL sperma numunesi (25x10⁶ spermatozoa/mL) üzerine FITC-PNA (100 µg FITC-PNA/1 mL PBS) temel çözeltisinden 10 µL ve PI (2 mg PI/1 mL distile su) çözeltisinden 2 µL ilave edilip, karanlık ortamda 37 °C'ta 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numune 10 µL Hancock sıvısıyla tespit edildi. Numuneden alınan 2 µL hacim, lam-lamel arasında akrozom bütünlüğü yönünden floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskopta değerlendirildi (Leica DM3000, Germany) Akrozomu yeşil floresan alanlar hasarlı akrozoma sahip spermatozoayı, akrozomu yeşil floresan boya almayanlar ise sağlam akrozoma sahip spermatozoayı gösterdi.

• Biyokimyasal parametreler

Sulandırılmış spermalar spermatozoadan ayrılmak

in için soğutmalı santrifüj kullanılarak 800 g'de, 20 dk boyunca santrifüj edildi, dipteki spermatozoa bu şekilde PBS ile 3 kez santrifüj edilerek yıkandı ve PBS ile 0.5 mL'ye tamamlandı. Homojenizasyon için sperma sıvısı buzlu su içerisindeki 2 mL'lik haznelere içerisine alındı ve 10 sn süreli sonikasyon işlemine maruz bırakıldı. Her uygulamanın sonunda 30 sn buz içerisinde bekletilmek suretiyle sonikasyon işlemi 6 kez tekrarlandı. Lipid peroksidasyon analizi için 120 µL homojenat alınıp üzerine 10 µL 0.5 mM BHT (bütil hidroksi toluen) ilave edilip karıştırıldı ve analiz yapılmaya kadar -86 °C'ta bekletildi. Kalan homojenat 8000 g'de, 15 dk boyunca santrifüj edildi ve süpernatantlar enzim analizleri için ayrılıp -86 °C'ta saklandı.

- *Lipid peroksidasyon (LPO)*

Lipid peroksidasyon düzeyleri ticari LPO-586TM Oxis Research (OxisResearchTM, Bioxytech, CA, 92202, USA) kiti ile spektrofotometrik olarak (UV 2100 UV-VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japonya) belirlendi. Kitin işlem prosedürüne göre analiz 45 °C'ta N-methyl-2-phenylindole adlı kromojen maddenin MDA ve 4-hydroxyalkenals (LPO) ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Bir mol MDA veya 4-hydroxyalkenal, 2 molekül N-methyl-2-phenylindole ile asetonitril içinde reaksiyona girmekte ve 586 nm'de dayanıklı bir kromofor meydana getirmektedir. Sonuçlar µmol (109 hücre/mL) olarak verildi.

- *Glutasyon peroksidaz (GPx)*

Glutasyon peroksidaz aktivitesi ticari OxisResearchTM Gpx-340TM (OxisResearchTM, Bioxytech, CA, 92202 USA) kiti ile spektrofotometrik olarak yapıldı. Kitin işlem prosedürüne göre glutasyon peroksidaz tarafından organik peroksitlerin reaksiyonu sonucu oluşan okside glutasyon, glutasyon redüktaz tarafından tekrar redükte edilmektedir. Redüksiyon aşamasında NADPH'nin NADP+'ya dönüşümü 340 nm'de azalan absorbansa neden olmakta ve GPx aktivitesi belirlenmektedir. 340 nm'deki absorbans düşüşüyle GPx aktivitesi ters orantılıdır. Sonuçlar mU/mL (109 hücre/mL) olarak verildi.

- *Süperoksit dismutaz (SOD)*

Süperoksit dismutaz aktivitesi ticari Sigma-Aldrich Fluka FL19160 (Chemical Co. USA) kitleri ile belir-

lendi. Kitin işlem prosedürüne göre ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit anyonları kromojen olarak kullanılan nitroblue tetrazolium (NBT) ile belirlenmektedir. NBT, süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek indirgenir ve formazon boyası meydana gelir, bu indirgenme SOD ile inhibe olur. Formazon renk yoğunluğunun azalması SOD aktivitesinin yüksekliğini gösterir. 440 nm'deki absorbans düşüşü ile SOD aktivitesi arasında ters orantı vardır. Sonuçlar % inh (109 hücre/mL) olarak verildi.

- *Katalaz (CAT)*

Katalaz aktivitesi ticari OxisResearchTM Catalase-520TM (OxisResearchTM, Bioxytech, CA, 92202 USA) kiti ile yapıldı. Kitin işlem prosedürüne göre hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümü CAT aktivitesi ile doğru orantılıdır. Örnekler bilinen bir konsantrasyonda hidrojen peroksit ile reaksiyona girer, tam olarak 1 dk inkübasyondan sonra sodyum azid ile reaksiyon durdurulur. Geriye kalan hidrojen peroksit, 4-aminophenazone ve 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic asit ile oksidatif reaksiyona girerek belirlenir. 520 nm'deki absorbans düşüşüyle CAT aktivitesi ters orantılıdır. Sonuçlar mU/mL (109 hücre/mL) olarak verildi.

- *İstatistiksel analiz*

SPSS paket programında yapılan istatistiksel analizde 10 farklı uygulamadan elde edilen verilerin ortalamaları kullanıldı. Lipoik asit içeren ve içermeyen sulandırıcı grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), aralarında önemli farklılık bulunan ikiden fazla grubu karşılaştırmak için de Duncan testi uygulandı. Farklılığın p<0.001 düzeyde olması önemli kabul edildi.

► Bulgular

Ekilibrasyon ve dondurma sonrası spermatozojik parametreler Tablo 1'de sunulmaktadır. Lipoik asitin kontrol gruplarına göre ekilibrasyon sonrası sperm parametrelerinde etkisi yoktu. Dondurma sonrası numunelerde lipoik asit 1 mM (%74.3±1.3), kontrol (%62.5±2.3) ve lipoik asit 4 mM (%65.0±3.1) gruplarına göre motilite yönünden önemli oranda iyileştirme sağladı (p<0.001). Spermatozoanın HOS test ve akrozom bütünlüğü üzerinde dondurma sonrası lipo-

Tablo 1. Farklı dozlarda lipoik asit içeren koç spermalarında ekilibrasyon ve dondurma sonrası spermatozojik parametreler.

Gruplar	Motilite %		HOS test %		FITC-PI % (Akrozom bütünlüğü)	
	Ekilibrasyon sonrası	Dondurma sonrası	Ekilibrasyon sonrası	Dondurma sonrası	Ekilibrasyon sonrası	Dondurma sonrası
Kontrol	80.0±1.6	62.5±2.3 ^b	65.0±2.2	61.3±2.3	55.4±8.4	30.6±3.4
Lipoik asit 1 mM	86.0±1.9	74.3±1.3 ^a	65.0±0.0	64.3±1.3	36.0±11	31.1±3.2
Lipoik asit 2 mM	83.0±3.0	68.6±1.8 ^{ab}	66.0±1.0	63.6±1.4	46.0±4.5	27.5±3.0
Lipoik asit 4 mM	80.0±1.6	65.0±3.1 ^b	66.0±1.0	61.9±1.6	49.0±11.5	26.6±2.1

^{a,b}: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir (Duncan test, p<0.001).

Tablo 2. Farklı dozlarda lipoik asit içeren koç spermalarında ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası biyokimyasal parametreler.

Gruplar	LPO ($\mu\text{mol}\cdot 10^9$ hücre/mL)		SOD aktivitesi (%inh- 10^9 hücre/mL)		GPx aktivitesi (mU/ ml- 10^9 hücre/mL)		CAT aktivitesi (mU/ ml- 10^9 hücre/mL)	
	Ekilibrasyon sonrası	Dondurma sonrası	Ekilibrasyon sonrası	Dondurma sonrası	Ekilibrasyon sonrası	Dondurma sonrası	Ekilibrasyon sonrası	Dondurma sonrası
Kontrol	12.6 \pm 3.3	12.2 \pm 1.5	2.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	10 \pm 0.9	16.4 \pm 1.2	17.9 \pm 2.5	88.6 \pm 8.8
Lipoik asit 1 mM	12.1 \pm 2.4	16.3 \pm 2.6	3.0 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	9.3 \pm 0.3	15.6 \pm 1.1	27.0 \pm 6.1	102 \pm 14
Lipoik asit 2 mM	11.4 \pm 1.3	15.6 \pm 3.5	3.1 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	9.4 \pm 0.8	15.3 \pm 1.1	36.5 \pm 7.5	89.0 \pm 14
Lipoik asit 4 mM	10.2 \pm 1.5	17.6 \pm 2.9	2.5 \pm 0.7	1.4 \pm 0.1	9.0 \pm 0.7	16.2 \pm 1.4	34.2 \pm 8.0	52.1 \pm 10

p>0.05: Gruplar arası farklılık istatistiki açıdan önemli değildir (Duncan test).

ik asitin etkinliği görülmedi (p>0.05).

Sperma numunelerine ait biyokimyasal parametreler Tablo 2'de sunulmaktadır. Lipoik asitin 1, 2 ve 4 mM dozlarının ekilibrasyon ve dondurma sonrası LPO düzeyleri, SOD, GPx ve CAT aktiviteleri yönünden kontrol gruplarına göre etkinlikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmadı (p>0.05).

► Tartışma

Koç spermalarının dondurulma işlemi sırasında soğuk şokuna karşı aşırı duyarlılık göstermeleri, hücreler üzerindeki hasarı artırarak çözüm sonrası in vitro ve in vivo spermatolojik özellikleri olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle sperma sulandırıcılarına katılan koruyucu ve antioksidan özellikli kimi katkı maddeleriyle ortamda gelişecek soğuk şoku hasarı minimize edilebilmektedir. Spermatozoonların plazma membranının doymamış yağ asitlerinden zengin olması nedeniyle reaktif oksijen türleri (ROS) saldırılarının oluşturduğu LPO'a son derece duyarlı olduğu bildirilmiştir. Spermatozoonun dondurulması-çözdürülmesi, membranlarda faz değişimine bağlı hasarlara ve oksidatif strese neden olmakta, gelişen oksidatif stres ve oluşan sitotoksik aldehytler spermatozoonların hasar görmesine ve bozulmasına neden olmaktadır (Aitken 1994, Baumber ve ark 2000).

Spermatozoon motilitesi genel olarak 3 temel faktöre bağlıdır: Regülasyon, yapısal bütünlük ve enerji sürekliliği. Hareketin regülasyonu orta kısımda özellikle flagellar ve prinsipal bölgeden kontrol edilmektedir. Flagellar kısım motilite aktivitesini sağlarken, prinsipal kısım ise hiperaktivasyondan sorumludur (Suarez ve ark 2007). Fakat orta kısımdaki doymamış yağ asitleri ve doymuş protein kanalları, bu yapıyı serbest radikal ataklarına duyarlı kılmaktadır. Sulandırıcıya eklenen lipoik asitin, spermatozoon motilitesini korumak için orta kısım yapılarını kuşatan bir kalkan oluşturduğu ve serbest radikallere olan direnci de artırdığı bildirilmektedir (Hamano 2007, Moreira ve ark 2007). Spermatozoon motilitesi yüksek aktiviteye sahip mitokondriyel yapılara gereksinim duyar. Bu yapıların yeteneği ATP temelli enzimlerin varlığına bağımlı ola-

rak çalışmaktadır. Lipoik asit ilavesi, mitokondriyel aktivitede oksidatif dekarboksilasyon metabolizmasına koenzim göreviyle (Plotnikov ve ark 2007) sperm motilitesi için gereksinim duyulan ATP'nin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır. Böylece lipoik asit spermatozoon metabolizmasında mitokondriyel disfonksiyonun insidensini azaltma yönünde eğilim gösterir (Moreira ve ark 2007). Bu çalışmada 1 mM lipoik asit çözüm sonu spermatozoon motilitesini kontrol grubuna göre önemli oranda artırmış, bu sonuç Ibrahim ve ark (2008) tarafından teke spermalarında yapılan bir çalışmayla desteklenmiştir.

Sperma, ROS temizleyiciliği görevi yapan SOD, CAT ve GPx gibi bir takım enzimatik antioksidanları içermektedir. Ortamda ROS üretimi ve eliminasyonu arasında bir denge oluşmakta, ROS'un hücreler üzerindeki olumsuz etkileri bu şekilde azaltılmaya çalışılmaktadır. Fakat spermanın sulandırılması, dondurulması ve çözdürülmesi ROS üretimini artırırken, ortamdaki antioksidan kapasiteyi de azaltmaktadır (Heinecke ve ark 1993, de Lamirande ve ark 1997, O ve ark 2006). Süperoksit dismutaz üç izoforma sahiptir: Sitosolik bakır/çinko-SOD, intra-mitokondriyel mangan-SOD ve ekstraselüler bakır/çinko-SOD. Bu izoform yapılar epididimal kökenli olup, spermatozoon sitosolünden ve mitokondriyel yapılarından süperoksit anyon ve hidroksi radikallerini uzaklaştırarak ve hücre sel redoks homeostazisini koruyarak oksidatif stresi kontrol altında tutmaya çalışır (Alvarez ve Storey 1983, Fridovich 1985). Glutasyon peroksidaz bir selenosistein bileşiği olarak, ortamda oluşan hidrojen peroksidin eliminasyonunda ve lipid peroksidlerinin detoksifikasyonunda rol almakta, fakat ortamdaki selenyum eksikliğinde ise GPx aktivitesi düşmektedir (Fridovich 1978, Meister and Anderson 1983, Rao ve Shaha 2000). Hem spermada hem de epididimis ve genital kanal dokularında bulunan bir antioksidan savunma sistemi olarak CAT, hidrojen peroksid ile süperoksit radikalinin detoksifiye edilmesinde ve NADPH oksidazın salınımının engellenmesinde görev alır. Bu görevleri nedeniyle spermatozoon fonksiyonlarına olumlu katkılar yaptığı bildirilmiştir (Auclair ve ark 1976, Zini ve ark 1993). Dondurma-çözdürme son-

rası antioksidan aktiviteler üzerine diğer bazı antioksidanların etkinlikleri rapor edilmesine rağmen (Bucak ve ark 2008, Sarıözkan ve ark 2009, Çoyan ve ark 2010), bu çalışmada lipoik asitin LPO ve antioksidan aktivite üzerinde herhangi bir etkinliği saptanmamıştır. Bu durum çalışmalardaki antioksidan aktivite ölçümlerinde kullanılan farklı yöntem, hayvan tür ve ırklarına bağlanabilir.

► Öneriler

Sonuç olarak, sulandırılmış koç spermasına düşük doz lipoik asit ilavesi dondurma-çözdürme sonrası motiliteyi arttırmaktadır. Bununla birlikte farklı sulandırıcı ve doz denemelerinin yapılması, bu çalışmaların farklı hayvan türlerinde ortaya konulması gerekmektedir.

► Teşekkür

Sunulan bu çalışma TÜBİTAK 1080522 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

► Kaynaklar

- Aitken RJ, 1994. Pathophysiology of human spermatozoa. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 6, 128-135.
- Alvarez JG, Storey BT, 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod*, 29, 548-555.
- Auclair C, Cramer E, Hakim J, Boivin P, 1976. Studies on the mechanism of NADPH oxidation by the granule fraction isolated from human resting polymorphonuclear blood cells. *Biochimie*, 58,1359-1366.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG, 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl*, 21, 895-902.
- Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A, 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Rumin Res*, 75, 128-134.
- Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN, Akalın PP, Ataman MB, Ömür AD, Güngör Ş, Küçükğünay S, Özkalp B, Sarıözkan S, 2010. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Res Vet Sci*, 89, 426-431.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C, 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, 2, 48-54.
- Fridovich I, 1985. Superoxide dismutase, regularities and irregularities. *Harvey Lect*, 79, 51-75.
- Fridovich I, 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-880.
- Hamano Y, 2007. Continuous infusion of lipoic acid rapidly reduces plasma beta-hydroxybutyrate with elevation of non-esterified fatty acids in broiler chickens. *Br J Nutr*, 97, 495-501.
- Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki L, Chait A, 1993. Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J Lipid Res*, 34, 2051-2061.

- Holt WT, 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62, 3-22.
- Ibrahim SF, Osman K, Das S, Othman AM, Majid NA, Rahman MPA, 2008. A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. *Clinics*, 63, 545-550.
- Leibo SP, Brandley L, 1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa, in: *The Male Gamet*, Ed; Gagnon C, Cache River Press, St Louis, pp: 502-515.
- Maxwell WMC, Watson PF, 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 42, 55-65.
- Meister A, Anderson ME, 1983. Glutathione. *Ann Rev Biochem*, 52, 11-60.
- Moreira PI, Harris PL, Zhu X, Santos MS, Oliveira CR, Smith, 2007. Lipoic acid and N-acetyl cysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in alzheimer disease patient fibroblasts. *J Alzheimers Dis*, 12, 195-206.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM, 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod*, 68, 1828-1835.
- O WS, Chen C, Chow PH, 2006. Male genital tract antioxidant enzymes and their ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol Cell Endocrinol*, 250, 80-83.
- Plotnikov EY, Kazachenko AV, Vyssokikh MY, Vasileva AK, Tcvirkun DV, Isaev NK, 2007. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. *Kidney Int*, 72, 1493-502.
- Polge C, Smith A, Parkes A, 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164-166.
- Rao AVSK, Shaha C, 2000. Role of glutathione S-transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 29, 1015-1027.
- Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen A, 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, 58, 134-138.
- Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P, 2006. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology*, 217, 71-78.
- Suarez SS, Marquez B, Harris TP, Schimenti JC, 2007. Different regulatory systems operate in the midpiece and principal piece of the mammalian sperm flagellum. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 65, 331-334.
- Terry C, Dhawan A, Mitry R, Lehec SC, Hughes RD, 2005. Preincubation of rat and human hepatocytes with cryoprotectants prior to cryopreservation can improve viability and function upon thawing. *Liver Trans*, 12, 165-177.
- Watson PF, 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60, 481-492.
- Zini A, de Lamirande E and Gagnon C, 1993. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl*, 16,183-188.

