



## Koç Spermasının Dondurulmasında Antioksidanların Etkisi\*

Ali Doğan ÖMÜR<sup>1✉</sup>

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

**Özet:** Antioksidanlar etki mekanizmasına göre iki türdür. Birinci grupta, otooksidasyon zincirini kırarak oksidasyonu geciktiren antioksidanlar bulunur ki bunlara primer antioksidanlar denir. İkinci gruptakiler ise sekonder antioksidanlar olup oksidasyonun başlamasını engelleyen antioksidanlardır. Kimi antioksidanlar ise birden fazla etki mekanizmasına sahip olduklarından çok fonksiyonlu antioksidanlar olarak adlandırılırlar. Antioksidatif savunma mekanizmaları; A, E, C vitaminleri,  $\beta$ -karoten, indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi bazı vitamin ve kimyasal maddeler ile çeşitli antioksidan enzimlerden oluşur. E vitamini, yapısındaki fenolik hidroksil grubundan dolayı güçlü bir antioksidan özellik gösterir. Zincir kırıcı antioksidatif etkinliği ile membran fosfolipitlerinde bulunan PUFA'yı serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturur. En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu  $H_2O_2$ 'ye dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve  $H_2O_2$ 'yi suya indirgeyen katalazdır. Koç sperması dondurmaya karşı oldukça hassastır. Bu durumun temel nedeni spermatozoa membranının önemli bir kısmını doymamış yağ asitlerinin (fosfolipitler) oluşturmasıdır. Dolayısıyla spermanın dondurulması sırasında spermatozoon membranı hasara uğramaktadır. Bu da fertilizasyon açısından olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Antioksidanlar ise sperma sulandırıcılarına katılmak suretiyle dondurma sürecinde oluşabilecek hasarları minimize etmektedirler.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan, Dondurma, Koç, Sperma.

## Effect of Antioxidants on Cryopreservation of Ram Semen

**Abstract:** Antioxidants are two types in terms of mechanism of their action. In the first group, the antioxidants retard the oxidation by breaking the autoxidation chain, called primary antioxidants. Whereas, the second group are secondary antioxidants that prevent the onset of oxidation. Because some antioxidants have multiple mechanisms of action, they are called as multi-functional antioxidants. Antioxidative defence mechanisms comprise some vitamins, chemical substances and various antioxidant enzyme, such as vitamins A, E, C,  $\beta$ -carotene, reduced glutathione (GSH). Vitamin E shows strong antioxidant property due to the phenolic hydroxyl group in its structure. It builds the first defence line that protects from free radical damage the PUFA in membrane phospholipids by chain breaker antioxidative activity. The most important antioxidant enzymes are superoxide dismutase (SOD) that converts the superoxide anion to  $H_2O_2$ , glutathione peroxidase (GSH-Px) that detoxifies the organic peroxides and catalase that reduces the  $H_2O_2$  to  $H_2O$ . Ram semen is rather sensitive against the cryopreservation, since the unsaturated fatty acids constitute the major part of sperm membrane. During the semen cryopreservation processes, sperm membrane suffers from damage. This causes to deteriorated architecture in terms of fertilisation. Supplementation of antioxidants minimises the damages related with cryopreservation of semen.

**Key words:** Antioxidant, Cryopreservation, Ram, Semen.

✉ Ali Doğan ÖMÜR

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

e-posta: alidoganomur@gmail.com

\*Doktora seminerinden özetlenmiştir.

## GİRİŞ

**K**oç spermalarının dondurulması ve dondurulmuş spermalarla ilk suni tohumlama uygulamaları Rusya'da başlamış, daha sonra Avrupa ülkelerine geçmiştir. Türkiye'de ise Cumhuriyet'in ilk yıllarında başlatılan koyun ıslahı çalışmaları günümüzde henüz istenen başarıya ulaşamamıştır (Tekin ve ark., 2006).

Bu durumun temel nedeni, spermatozoa membranının önemli bir kısmını doymamış yağ asitlerinin (fosfolipitler) oluşturmasıdır. Bu durum spermatozoanın dondurulması sırasında yapılan soğutma işlemleri sırasında membranın geriye dönüşümü olmayan sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olarak, membran içi enzimlerin değişimlerine yol açmakta ve çözüm sonu canlılığın kaybolmasına neden olmaktadır (Watson, 1995).

Dondurulmuş/çözdürülmüş spermatozoanın lipid peroksidasyona daha kolay uğraması ve membranların büyük oranda lipid içermesi gelişen peroksidatif hasara ve spermatozoon disfonksiyonlarına karşı etkili antioksidan sistemlerinin araştırılmasına yol açmıştır (Alvarez ve Storey, 1983; Bilodeau ve ark., 2000; Maia ve ark., 2010; Sicherle ve ark., 2011).

Son yıllarda dondurulma ve çözdürülme esnasında spermatozoonlarda ortaya çıkan hasarlar mikro düzeyde ortaya konabilmiş, dondurulma sırasında oluşan oksidatif stresin önemli hasarlara yol açtığı bildirilmiştir (Potts ve ark., 2000).

Dondurulmuş-çözdürülmüş koç spermalarından elde edilen düşük fertilité oranları, araştırmacıları bu konuda çalışmaya sevk etmiş ve farklı sulandırıcı formülasyonları, sulandırıcıya çeşitli hormon, vitamin, şeker, antioksidan maddelerin ilave edilmesine yöneltmiştir (Gökçen ve ark., 1985; Chen ve ark., 1993).

Sulandırıcı içerisine katılan çeşitli kryoprotektif maddeler ise dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların fertilitésini olumsuz yönde etkilemektedir. Dolayısı ile gliserol gibi kontraseptif özelliğe sahip kryoprotektanların oranının azaltılabilmesi, sulandırıcı

içerisine katılacak antioksidanlara bağlı olduğu öne sürülmektedir (Purdy, 2006; Bucak ve ark., 2007).

Dondurulmuş koç spermaları ile son yıllarda geliştirilmiş olan laparoskopi yardımıyla intra uterin tohumlama yöntemiyle oldukça iyi sonuçlar alınmaktadır. Ancak bu tohumlama yönteminin büyük koyun sürüleri için pratik ve ucuz olmaması, uygulama zamanının uzun sürmesi, ayrıca embriyonik ölümlere yol açması gibi olumsuz yönleri de vardır (Tekin ve ark., 2006). Bu nedenle araştırmacılar koça ait faktörlere yönelmiş, koç spermalarının dondurma teknik ve yöntemleri üzerinde yoğunlaşmışlardır (Windsor ve ark., 1994).

Kriyoprezervasyon koç spermalarının spermatozoa motilitésini düşürmesi yanında, spermatozoonun plazma membranı ve akrozom bütünlüğünün bozulmasına da yol açmaktadır. Son yıllarda doğal olarak epididimis ve seminal plazmanın yapısında yüksek konsantrasyonlarda bulunan inositol, taurin, hipotaurin, askorbik asit, desferal, prolin, alfa-tokoferol, BHT (Bütül hidroksi toluen), SOD (Süperoksit dismutaz), katalaz gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir (Pomares ve ark., 1996). Antioksidan özelliği olan maddelerin in vitro koşullarda koç spermalarının kısa ve uzun süreli saklanması lipid peroksidasyona karşı spermatozoon motilitésini ve spermatozoanın membran bütünlüğünü korumaktadır (Dziuk ve ark., 1972).

## Koç Spermalarının Genel Özellikleri

### Makroskobik Muayene Bulguları

Diğer çiftlik hayvanları ile kıyaslandığında koç ve tekelerde ejakulat hacmi çok düşüktür. Bu durum birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Bunların başında, ırk, yaş, yemleme, dişilerle beraber bulunma, hastalıklar, sperma alma yöntemi, sperma alma sıklığı, sperma alma zamanı ve mevsim koç ya da tekenin

sperma verimine doğrudan etki eden faktörlerdir. Koç ve tekelerde ortalama ejakulat hacmi 1 cm<sup>3</sup> tür (Evans ve Maxwell, 1987).

Sperma normalde koyu kıvamlıdır ve akışkanlığı az viskoz bir yapıdadır. Ancak yabancı madde karışımı, hastalıklar ve sperma alma sıklığına bağlı olarak çok suludan çok kıvamlıya kadar değişir. Spermanın kıvamı ile yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişki vardır ve deneyimli teknik elemanlar kıvamdan konsantrasyonu tahmin edebilirler. Spermatozoitlerin toplu hareketleri de spermanın niteliği konusunda bir fikir verir. Bu gözlem sırt ışığa verilerek incelenebilmektedir. Eğer dalgalanma, dairesel ve içten kaynama şekli görülürse spermatozoit yoğunluğunun fazla olduğu anlaşılır. Spermatozoit yoğunluğu azalırse sperma süt veya bulanık su görünümüne dönüşür (Evans ve Maxwell, 1987).

Spermanın asitliği özel olarak geliştirilmiş indikatör ya da turnusol kağıtlarıyla ya da elektrikli bir pH-Metre ile ölçülebilir. Spermanın pH değeri testislerden ve ek üreme bezlerinden salgılanan sperma plazmasının yapısına, yabancı madde karışımına durumuna göre değişir. Spermanın normal pH' sı hafif asidiktir ve 6.4-6.5 olmalıdır (Evans ve Maxwell, 1987).

#### **Mikroskopik Muayene Bulguları**

Sperma kalitesi için en önemli ölçüttür. Sperma kalitesinin belirlenmesi, bir yönde güçlü hareketli spermatozoitlerin oranının saptanmasına bağlıdır. Kitle hareketi sulandırılmamış sperma örneklerinde ve küçük (5x ya da 10x) oküler büyütmelede saptanır. Gözleme dayalı olarak subjektif çok iyiden hareketsize doğru puanlama yapılır. Mikroskop altında 4 tip spermatozoit hareketi görülür. Bunlar; ileriye doğru hareket, yerinde dönerek yaptığı dairesel hareket, durduğu yerde titreşim hareketi ve geriye hareket. Koç spermaları gibi yoğun spermaların motilitesinin değerlendirilmesi amacıyla spermanın izotonik tampon solüsyonlarla sulandırılması gerekir. Lam üzerine bir miktar sulandırılmış sperma damlatılır,

üstü lamel ile örtüldükten sonra ısıtma tablası üzerinde mikroskoptan ya da mikroskoba bağlı videomonitörden ileriye doğru güçlü hareket eden spermatozoitlerin oranı yüzde olarak tahmin edilir. Bu oran suni tohumlama ejakulatlarında en az % 70 olmalıdır (Evans ve Maxwell, 1987).

Her ejakulat morfolojik olarak anormal ve ölü spermatozoitler içermektedir. Suni tohumlamada kullanılacak ejakulatlarda bunların toplam oranı %15-20'yi geçmemelidir. Spermatozoadaki normal olmayan morfolojik yapılar ve ölü olanları normal ışık mikroskobu veya elektron mikroskobu ile saptanabilir. Normal ışık mikroskoplarında özel boyama teknikleri kullanılır. Bu amaçla Nigrosin-Eosin, Opal Mavisi, Anilin Mavisi olarak adlandırılan özel boya çözeltileri kullanılır. Bu amaçla bir miktar sulandırılmamış sperma örneği alınır ve bir pipet yardımı ile boya damlatılarak lam üzerinde iyice karıştırılır. Bir başka lam alınarak üzerinde örnek bulunan lam ile 45 derecelik açı oluşturacak şekilde tutulur, ince bir şerit çekilir ve kurumaya bırakılır. Daha sonra mikroskop altında morfolojik olarak anormal ve ölü olanlar saptanır sayılır ve oranlanır. Boyama sırasında canlı olan sperm hücreleri boya maddesinin hücre zarından geçişine izin vermez. Bu durumda boyanan spermatozoitler "ölü" olanlardır. Yarı boyanmış olanlar da "intakt" ölmek üzere olan inaktif sperm hücreleridir. En çok rastlanan spermatozoon anomalileri, aşırı iri ya da küçük baş, kuyruksuzluk, çatal kuyruk, çift kuyruk ya da kafa kafaya yapışıklıktır (Lasley ve ark., 1942; Evans ve Maxwell, 1987).

Makroskopik olarak ve salt deneyime göre saptanan sperma konsantrasyonu yanlışlıklara neden olabilir. Spermanın yoğunluğu özellikle sulandırma oranı için çok önemlidir. Spermanın yoğunluğu daha önceleri Hemositometre adı verilen ve kan hücrelerinin sayımında kullanılan yöntem ile sayılmakta ve oranlanarak tahmini yoğunluk hesaplanmaktaydı. Bugün ise bu amaca yönelik olarak geliştirilmiş çok ileri tekniklerle ve her tür için ayrı kullanılabilen bilgisayar yardımı sperm analiz cihazları

(CASA) mevcuttur (Amann ve Waberski, 2014). Koç ve teke spermalarının yoğunluğu ortalama olarak 2.5-3.0 x 10<sup>9</sup>/ ml dir (Evans ve Maxwell, 1987).

### Antioksidanların Yapısı ve Fonksiyonları

Genel olarak antioksidan maddelerin görevi; serbest radikallerin hidrojen koparıp çalmasında, kendilerini ortaya atarak serbest radikallere hidrojen verip etkinliklerini durdurmaaktır. Yani antioksidan maddeler, serbest radikalleri daha başlangıçta doyurarak onların devamlı etkinliklerine mani olmaktadır. Fakat serbest radikal oluşumu ışık ve metaller nedeniyle devam ediyorsa buna bağlı olarak antioksidan madde gittikçe harcanıp tüketilmektedir. Eğer gerekli tedbirler alınıp da yeterli miktarda antioksidan katılmış ise daha önce serbest radikaller durdurulmuş olacaktır ve antioksidan etki uzun süre devam edecektir (Çakmak, 2003).

Antioksidanların serbest oksijen radikallerine karşı etkileri; zincir reaksiyonun başlamasını durdurmaları, başlayan radikal zincir reaksiyonunu kırmaları, radikal oluşumunun başlamasına engel olmaları, peroksitleri parçalamaları ve lokal oksijen yoğunluğunu azaltmaları suretiyle şekillenmektedir (Cheeseman ve Slater, 1993).

Antioksidatif savunma mekanizmaları; A, E, C vitaminleri, β-karoten, indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi bazı vitamin ve kimyasal maddeler ile çeşitli antioksidan ve enzimlerden oluşur. E vitamini, yapısındaki fenolik hidroksil grubundan dolayı güçlü bir antioksidan özellik gösterir. Zincir kırıcı antioksidatif etkinliği ile membran fosfolipitlerinde bulunan PUFA'yı serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturur (Aydilek ve Aksakal, 2003).

En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi suya indirgeyen katalazdır (Guemouri ve ark., 1991; Marti ve ark., 2008).

Her antioksidan farklı serbest radikale etkilidir ve antioksidanlar kombine edildiklerinde birbirlerini

tamamlayıcı etki gösterirler (Vishwanath ve Sahannon, 1997).

### Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, etki mekanizmasına göre iki türdür: Birinci grupta, otooksidasyon zincirini kırarak oksidasyonu geciktiren antioksidanlar bulunur ki bunlara primer antioksidanlar denir; ikinci gruptakiler ise, sekonder antioksidanlar olup, oksidasyonun başlamasını engelleyen antioksidanlardır. Kimi antioksidanlar ise birden fazla etki mekanizmasına sahip olduklarından çok fonksiyonlu antioksidanlar olarak adlandırılırlar (Çakmak, 2003).

#### Primer Antioksidanlar

Primer antioksidanlar, elektron vericisi olarak serbest radikallerle reaksiyona girip otooksidasyonu yarıda keserler. Böylece, zincirleme devam eden otooksidasyon işlemi yarıda kesilerek durdurulur. Başlıca primer antioksidanlar; tokoferoller (Vitamin E), butil-hidroksi-anizol (BHA), butil-hidroksi-toluen (BHT), tersiyer-butilhidroquinon (TBHQ) ve ethoksiquindir (Çakmak, 2003).

#### Sekunder Antioksidanlar

Sekunder antioksidanlar, oksidasyonu geciktirerek yağların otooksidasyonunu engellerler. Etki mekanizmaları; yağların oksidasyonunu katalize eden metal iyonlarını bağlama, oksijene saldırma ve UV ışınlarını absorbe etme tarzındadır. Başlıca sekunder antioksidanlar şunlardır:

Şelatlar: Sitrik asit, amino asitler, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve bazı fosforik asit türevleri

Oksijeni toplayan bileşikler: Askorbik asit (Vitamin C), askorbil palmitat, sülfidler, eritorbik asit ve sodyum eritorbat

Antioksidatif enzimler: Glukoz oksidaz (Çakmak 2003).

#### Çok Fonksiyonlu Antioksidanlar

Fosfolipitler ve maillard reaksiyonu ürünleri gibi kimi reaksiyonlar lipitlerin oksidasyonunu birden fazla

mekanizmayla önlerler. Fosfolipitlerin antioksidan etkileri metalik iyonları bağlama ve hidroperoksitleri dekompoze etme şeklindedir. Ayrıca, fosfolipitler primer antioksidanların rejenerasyonunu da artırır. Maillard ürünleri ise; metal bağlama özellikleri ile ve hidroperoksitlerin serbest radikallere dönüşümlerini engelleyerek antioksidan etki gösterirler (Çakmak, 2003).

#### Antioksidanların Sperma Üzerine Etkinliği

Memeli hayvanların vücut sıvıları ve reproduktif dokularında yüksek oranlarda bulunan antioksidan maddeler, eksojen olarak sperma sulandırıcılarına katıldığında spermadaki serbest radikallerin neden olduğu hücre membranlarındaki yağ asitleri ve fosfolipitlerin peroksidasyonunu minimuma indirmektedir. Böylece lipid peroksidasyonunun spermatozoon akrozomunda neden olduğu hasar azaltılabilmekte ve dolayısıyla elde edilen döl verimi önemli ölçüde yükseltilebilmektedir (Aitken ve ark., 1989; Beconi ve ark., 1991; Vishwanath ve Sahannon, 1997; Donnelly ve ark., 2000; Camara ve ark., 2011).

Seminal plazma, içerdiği antioksidan etkili maddeler ile spermatozoonları oksidatif strese karşı korur. Spermatozoonun DNA'sı ise oksidatif strese karşı kendisinin güçlü yapısı ve seminal plazmada bulunan antioksidan maddeler tarafından korunmaktadır (Saleh ve Agrawal, 2002).

Birçok araştırmacı çeşitli antioksidanları kullanarak farklı yöntemlerle koç spermalarını dondurmuşlardır.

Dondurulmuş koç spermalarından dölverimini artırmak amacıyla özellikle dondurma aşamasında spermaya antioksidanlar, vitaminler ve hormonlar katılmaktadır. Vit. E'nin koç spermatozoonlarının membran bütünlüğünü koruyarak ve membran dayanıklılığını artırarak akrozom bozukluklarının oluşmasını önlediği ve bu nedenle Vit E katılarak dondurulmuş koç spermalarıyla daha iyi döl verimi sağlandığı belirtilmiştir (Gökçen ve ark., 1985). Ayrıca, Vit E'nin bulunduğu ortamda peroksitlerin yıkımlandığı ya da üretimlerinin azaldığı ve oksidasyonun yavaşladığı bildirilmektedir (Tümen ve ark., 1991).

Sanchez-Partida ve ark. (1997), farklı antioksidanlar katarak dondurdukları koç spermalarında çözündürme sonrası spermatozoa motilitesini, 50 mM taurin katılmış %3-5 gliserol bulunduran Tris sulandırıcısıyla %60' ın üzerinde bulduklarını belirlemişlerdir.

Uysal ve ark. (2000), farklı antioksidanlarla dondurdukları koç spermalarından çözündürme sonrası en yüksek spermatozoa motilitesini (%62.83) ve en düşük anormal spermatozoa oranı (%15.83) ile ölü spermatozoa oranını (%32.77) 50 mM taurin bulunduran Herpes sulandırıcısıyla elde etmişlerdir. Yine Uysal ve ark. (2000), 10 mM Vitamin C veya 50 mM taurin içeren Tris ve Hepses sulandırıcılarıyla dondurdukları Akkaraman ırkı koçlardan çözündürme sonrası en iyi sonuçları hepes+taurinle elde etmişlerdir.

Sanchez-Partida ve ark. (1997), koç spermalarının dondurulmasında 100 mM ve üzeri konsantrasyonlarda kullanılan taurinin daha düşük dozlarının tersine spermatozoa motilitesini önemli ölçüde düşürdüğünü bildirmişlerdir. Gökçen ve ark. (1985)'a göre, koçlarda antioksidan katarak sulandırılan spermada antioksidanların akrozom bütünlüğü üzerine olumlu etkisinin olduğu saptanmıştır. Pomares ve ark. (1994) yaptıkları çalışmalarında, sperma sulandırıcısına glutatyon peroksidaz katarak dondurdukları koç spermalarında çözüm sonrası akrozom bozukluklarının azaldığını tespit etmişlerdir. Maxwell ve Stojanov (1996), koç spermalarına kattıkları SOD, katalaz, sitokrom-c ve glutatyon peroksidazın spermatozoa motilitesinde zamana bağlı olarak şekillenen düşüşü azalttığını ve akrozom bütünlüğünü koruduğunu bildirmişlerdir. Berlinguer ve ark. (2003), koç spermalarına antioksidan katarak sulandırmışlar ve muhafaza süresi boyunca yaptıkları kontrollerde antioksidanların spermatozoon canlılığı üzerine olumlu etkisi olduğunu saptamışlardır. Gökçen ve ark. (1985), koçlarda ejakülatin bir bölümüne PGF2 $\alpha$ , bir bölümüne Vit E katmışlar ve bir bölümünü ise kontrol olarak bırakmışlardır. Spermayı dondurup çözdürdüklerinde, çözündürme sonrası akrozom bozukluğu oranının Vit E

katılan grupta diğer gruplara göre önemli derecede düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Sarlos ve ark. (2002), koç spermalarına antioksidan kattıkları çalışmalarında 48. saate kadar antioksidanın koruyucu etkili olduğunu, bu saatten sonra ise motilitede belirgin bir düşüş görüldüğünü bildirmektedirler. Upreti ve ark. (1997) koç spermaları üzerine yaptıkları çalışmada, farklı antioksidanları kombine olarak kullanmışlar ve bu antioksidanların tek başına kullanıldığı gruplara göre daha olumlu sonuçlar verdiklerini vurgulamışlardır.

Ari ve ark. (2012) sperma sulandırıcısına kattıkları ergotiyoninin, koç spermatozoonlarının motilitesini ve membran bütünlüğünü dondurmanın olumsuz etkilerine karşı koruyabileceğini göstermişlerdir.

#### Serbest Radikaller ve Etkileri

Serbest radikaller, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, alerji, diyabet, katarakt gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol oynayan ve bu nedenle son zamanlarda üzerinde en çok çalışılan konular arasında yer almaktadır. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküller olup bu elektronlarını paylaşabilmek için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerler. Radikallerle reaksiyona giren moleküllerin bir elektronu azaldığı için onlar da reaktif hale gelir ve bu reaksiyon zincirleme olarak devam eder. Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Bu radikallerin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Eğer bu radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşarlarsa hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli bileşenlerinde hasara neden olurlar. Lipitler serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Serbest radikaller, yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna (LPO) neden olurlar. Çoklu

doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif hasarı kendi kendini devam ettiren zincirleme bir reaksiyon olup geri dönüşümsüz membran hasarlarına neden olur (Aydilek ve Aksakal, 2003).

Oksidatif stresin normal spermatozoon fonksiyonlarını bozabileceği ilk olarak McLeod (1943) tarafından, spermanın yüksek oksijen basıncı altında inkubasyonu ile spermatozoon motilitesinin hızlı bir şekilde azaldığının görülmesiyle ortaya konulmuştur. Aynı araştırmacı spermatozoonların, spermada bulunan çeşitli ajanların etkisiyle hidrojen peroksit üretebileceğini ve üretilen hidrojen peroksitin de katalaz enzimi tarafından ortadan kaldırılabileceğini belirtmiştir (O'Flaherty ve ark., 1997).

#### SONUÇ

Koç spermalarının dondurulmasında günümüze kadar birçok sulandırıcı denenmişse de henüz istenen başarıya ulaşılamamıştır. Üstelik sulandırıcılara katılan gliserol, DMSO ve yumurta sarısı gibi kriyoprotektanlar bile, koç spermalarının dondurulmasında alıştırma ve çözündürme sonrası spermatozoon motilitesi ve plazma membranlarındaki hasarı dolayısıyla fertilitenin düşmesini önleyememektedir (Pontbriand ve ark., 1989).

Ancak son yıllarda seminal plazmanın da doğal komponentleri olan taurin, hipotaurin inositol, prolin, BSA, SOD, katalaz, BHT, desferal, askorbik asit ve alfa tokoferol gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir (Risopatroni ve ark., 2002). Birçok araştırmacı sperma sulandırıcılarına bu antioksidan maddeleri katarak dondurdukları koç spermalarında çözündürme sonrası spermatozoa motilitesinin yükseldiğini, akrozom bozukluklarının ve plazma membran hasarının azaldığını göstermişlerdir (Tekin ve ark., 2006).

Sulandırıcılarda antioksidanların kullanılması kriyoprotektanların daha düşük konsantrasyonlarda kullanılmasını sağlamaktadır (Milanova ve Sokolovskaya, 1980). Antioksidan bileşiklerin aynı zamanda kriyoprotektan özelliklerinin de olması, bu maddelerle dondurulan spermalardan daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamaktadır (Kobayashi ve ark., 1991).

## KAYNAKLAR

- Aitken RJ., Clarkson JS., Fishel S., 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41(1), 183-97.
- Alvarez JG, Storey BT., 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*, 29, 548-55.
- Amann RP., Waberski D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81 (1), 5–17.
- Ari UC., Kulaksız R., Ozturkler Y., Yildiz S., Lehimcioglu NC., 2012. Effect of L-(+)-ergothioneine (EGT) on freezability of Tushin ram semen extended with milk based extender. *Reproduction in Domestic Animals*, 2012; 47, 74.
- Aydilek N., Aksakal M., 2003. Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14, 22-25.
- Beconi MT., Affranchino MA., Schang LM., Beorlegui NB., 1991. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. *Biochemistry international*, 23(3), 545-53.
- Berlinguer F., Ledda S., Rosati I., Bogliolo L., Leoni G., Naitana S., 2003. Superoxide dismutase affects the viability of thawed European mouflon (*Ovis g. musimon*) semen and the heterologous fertilization using both IVF and intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction, Fertility and Development*, 15 (1-2), 19-25.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirdard MA, Gagnon C., 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 55, 282-88.
- Bucak MN., Ateşşahin A., Varışlı Ö., Yüce A., Tekin N., Akçay A., 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, 60, 1060-1067.
- Câmara DR., Silva SV., Almeida FC., Nunes JF., Guerra MM., 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 76(2), 342-50.
- Chen Y., Foote RH., Brockett CC., 1993. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30(4), 423-31.
- Cheeseman KH., Slater TF., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-93.
- Çakmak B., 2003. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, NRA Bülteni, 28.
- Donnelly ET., McClure N., Lewis SE., 2000. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*, 15(1), 61-8.
- Dziuk PT., Lewis JM., Graham EF., Moyer RH., 1972. Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen semen at an appointed time in the ewe. *Journal of Animal Science*, 35, 572-575.
- Evans G., Maxwell VMC., 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. 22-31, Butterworths, Wisconsin.
- Gökçen H., Aştı RN., Çekgöl E., Şener E., 1985. Prostaglandin F2 alfa ve Vit.E katılarak dondurulan koç spermalarında akrozom morfolojisi ve dölvürümü üzerinde araştırmalar Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 4, 1-3.
- Guemouri L., Artur Y., Herbeth B., Jeandel C., Cuny G., Siest G., 1991. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clinical Chemistry*, 37, 1932-7.
- Kobayashi T., Miyasaki T., Natori M., Nozawa S., 1991. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: Superoxide dismutase activity and lipid peroxidase in human seminal plasma and spermatozoa. *Human Reproduction*, 6, 987-91.

- Lasley JF., Easlaey GT., McKENZIE, 1942. A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa. *Anatomical Record*, 82, 167.
- Maia MS., Bicudo SD., Sicherle CC., Rodello L., Gallego IS., 2010. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reproduction Science*, 122 (1-2), 118-123.
- Marti E., Marti J.I., Muin O-Blanco T., Cebria N-PeRez JA., 2008. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *Journal of Andrology*, 29, 4.
- Maxwell WM., Stojanov T., 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, 8(6), 1013-20.
- Milanova VK., Sokolovskaya II., 1980. Long time storage of ram semen and new possibilities of large scale selecting in sheep breeding. *Vestnik Selskok Nauki*, 12, 122-132.
- O'Flaherty CM., Beconi MT., Beorlegui NB., 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia*, 29, 269-275.
- Pomares CC., Stojanov T., Eppleton J., Maxwell WMC., 1994. Effect of glutathion peroxidase on the survival of goat and ram spermatozoa during liquid storage. *Proc 7th International Symposium of Spermatology Abstracts*, 9, 24-28.
- Pomares CC., Stojanov T., Eppleton J., Maxwell WMC., 1996. Effect of glutathion peroxidase on the survival of goat and ram spermatozoa during liquid storage. *Proc 7th International Symposium of Spermatology Abstracts*, 9, 24-28.
- Pontbriand D., Howard JG., Schiwe MC., Stuart LD., Widt DE., 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26, 341-354.
- Potts RJ., Notarianni LJ., Jefferies TM., 2000. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 447, 249-256.
- Purdy PH., 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63, 215-225.
- Risopatroni J., Catalan S., Miska W., Schill WB., Sanchez R., 2002. Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 37, 347-351.
- Saleh RA., Agarwal A., 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, 23(6), 737-52.
- Sanchez-Partida LG., Setchell BP., Maxwell MC., 1997. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 9, 689-696.
- Sarlós P., Molnár A., Kókai M., Gábor G., Rátky J., 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*, 50(2), 235-45.
- Sicherle CC., Maia MS., Bicudo SD., Rodello L., Azevedo HC., 2011. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Ruminant Research*, 95 (2-3), 144-149.
- Tekin N., Uysal O., Akçay E., Yavaş İ., 2006. Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermalarının dondurulması üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 53, 179-184.
- Tümen H., Gökçen H., Soylu MK., Doğan İ., 1991. Değişik düzeylerde vitamin-E katılarak sulandırılan koç spermalarının spermatolojik özellikleri ve dölverimi üzerinde araştırmalar.



- Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 10(1-2-3), 91-98.
- Upreti GC., Jensen K., Oliver JE., Duganzich DM., Munday R., Smith JF., 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, 48(2-4), 269-78.
- Uysal O., Kinet H., Çevik M., Çetinkaya S., 2000. Değişik antioksidanlar içeren farklı sulandırıcılarla dondurulmuş koç spermalarından elde edilen dölverimi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 47, 177-189.
- Vishwanath R., Shannon P., 1997. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reproduction, Fertility and Development*, 9(3), 321-31.
- Watson PF., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 871-91.
- Windsor PP., Szell AZ., Buschbeck C., Edward AY., Milton TTB., Buchrell BC., 1994. Transcervical artificial insemination of Western Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 42, 147-157.