

## AKROZOM REAKSİYONUNUN SPERMA KALİTESİ, MUHAFAZASI ve SUNİ TOHURLAMA BAŞARISINDAKİ ROLÜ

Ömer UÇAR\*

Yayın Kodu: 2003/17-D

**Özet:** Sunulan derlemede, *in vitro* akrozom reaksiyonunun (AR) sperma kalitesi, kısa/uzun süreli muhafazası ve suni tohumlama (ST) uygulamalarında başarılı fertilitite oranları elde etmedeki önemi hakkında genel bir değerlendirme yapılmıştır. Buna göre; a) sperma kalite parametreleri arasında AR'nin sperm fonksiyonunun en kritik göstergelerinden birisi olduğu, b) kısa süreli (4°C'de) soğukta saklama yöntemlerinin kapasitasyon (veya AR) üzerine, fiziksel ve kimyasal değişiklikler sonucu, 'kısmen' olumsuz etkili olduğu, c) uzun süreli (-196°C'de dondurarak) saklama yöntemlerinin ise başta akrozomal morfoloji (veya AR) olmak üzere hemen hemen bütün spermatozoal kısımlar üzerine olumsuz etkili olduğu ve d) damızlık hayvanların fertilitésinin gelişimini izlemede ve sonraki potansiyel fertilitelerinin tahmininde *in vitro* AR testinin güvenilir bir araç olabileceği öngörülmektedir. Dolayısıyla, çiftlik hayvanlarının pek çoğunda rahatlıkla kullanılabilen *in vitro* AR testinin, sperma kalitesi, muhafazası ve ST fertilitesi hakkında çok önemli bilgiler sağlayabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Akrozom reaksiyonu, sperma kalitesi, muhafaza, suni tohumlama, fertilitite.

### The Role of Acrosome Reaction in Semen Quality, Preservation and the Success of Artificial Insemination

**Summary:** In the present review, the importance of acrosome reaction (AR) *in vitro* to semen quality, short/long term storage and the achievement of successful fertility rates in artificial insemination (AI) applications was evaluated. According to this, it is suggested that a) AR is one of the most critical signs of sperm function amongst semen quality parameters, b) the methods of short term cold storage (at 4°C) impair 'partially' capacitation (or AR), caused by physical and chemical changes, c) the methods of long term storage (at -196°C by freezing) deteriorate mainly the acrosomal morphology (or AR) as well as virtually all parts of the spermatozoon and d) AR *in vitro* might be a reliable tool in monitoring development of fertility of sire animals and the prediction of their subsequent fertility potential. Therefore, *in vitro* AR test which can be used in many farm animals, would provide crucial data on the semen quality, storage and fertility of AI.

**Keywords:** Acrosome reaction, semen quality, preservation, artificial insemination, fertility.

### GİRİŞ

Sperma kalitesinin en önemli göstergesi, spermatozoonların ovumu döllemesi ve sonrasında embriyogenesinin sürmesidir<sup>1</sup>. Ancak, gebelik sonucunu beklemek pratik olmadığından, öncelikle sperma muayenesi yapılmalıdır. Bu bağlamda, akrozom reaksiyonu (AR) testinin sperma kalitesinin belki de en pratik ve güvenilir göstergelerinden birisi olduğu bildirilmiştir<sup>2</sup>. Dolayısıyla, sunulan derlemede sperma kalitesi, muhafazası ve suni tohumlama (ST) başarısında AR'nin önemi irdelenmiştir.

### AKROZOM FİZYOLOJİSİ

Akrozom, spermatozoon nükleusunun ön-uç kısmını örten, membran-bağımlı ve kep-benzeri, spermatid'teki Golgi kompleksinden köken alan<sup>3</sup>, türlerarası değişik şekillerde<sup>4</sup> ve fertilizasyonda gerekli güçlü enzimler<sup>5</sup> içeren bir yapıdır. AR esnasında, hücre dışı kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) iyonu varlığında, zona pellusida (ZP) proteinleri<sup>6</sup>, progesteron<sup>7</sup> ve kalsiyum iyonofor

A23187<sup>8</sup> gibi uyarıcılar hücre içi Ca<sup>2+</sup> yoğunluğunu artırarak membran yerel şarj yükünü değiştirir<sup>9</sup> ve H<sup>+</sup> iyonu yoğunluğunu artırır<sup>10</sup>. Sonuçta, dış-akrozomal membran (DAM) ve plazma membranı (PM) birleşerek (füzyon)<sup>11</sup> yer yer vezikül oluşumuna ve akrozomal enzimlerin salınımına yol açar. Ovum, spermatozoonun oolemmaya ulaşmadan önce geçmek zorunda olduğu<sup>4,6</sup> glikoprotein yapıda bir membran (ZP)<sup>12</sup> ile örtülüdür. Yani, AR en az iki işleve sahiptir: 1) spermatozoonun ZP'yi geçişine (penetrasyon) ve 2) oolemmayla füzyonuna olanak sağlama<sup>4</sup>.

Testisi terkeden spermatozoonlar, dışı genital kanalında canlı kalmaz ve oositleri dölleyemez<sup>13,14</sup>. Epididimal geçiş esnasında, PM ve akrozomla ilgili moleküler yapılar işlevsel olarak olgunlaşır<sup>15</sup> ve AR geçirme yeteneği kazanılır<sup>16</sup>. Olgun hücreler epididimisten ayrıldıktan sonra aktif olarak hareket edebilir<sup>14,17</sup>. ST sonrası spermatozoonlar, yeni ovule olmuş ovumlara penetrasyon öncesi bir süre dışı genital kanalında kalır ve bu süre türlere göre farklılıklar gösterir<sup>18,19</sup>. Bu ferti-

\* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE



lizasyona 'hazırlık' aşaması (kapasitasyon)<sup>20</sup> AR için gereklidir<sup>21</sup>. Bu sırada, başlıca PM'nin yapı ve işlevinde; a) örtü materyalinin/antijenlerinin farklılaşması/ayrılması, b) glikoproteinlerin serbest bırakılması, c) lektin-bağlama yeteneğinde değişiklikler, d) membran içi partikül yapısı ile membran ve lipidlerin akıcılığının değişmesi ve e) kolesterolün ayrılması gibi değişiklikler oluşur<sup>22</sup>. Dolayısıyla kapasitasyon; hiperaktif motilite ve ZP'de değişimler ile AR geçirme sonrasında hücre ölümüyle sonuçlanan pozitif destabilizasyon olaylarını kapsar<sup>23</sup>.

Genellikle, spermatozoonların kapasitasyonu tamamlaması<sup>10</sup> ve oositleri döllemesi için hücre dışı  $Ca^{2+}$  iyonu gereklidir. Başka bir deyişle, motilite (hiperaktivasyon) ve AR  $Ca^{2+}$  bağımlı bir olaydır<sup>24,25</sup>. Üstelik, *in vitro*  $Ca^{2+}$  regülasyonu motilite ve *in vivo* fertilitiyi etkiler<sup>26</sup>. Dolayısıyla, kapasitasyon ve AR'yi kontrol eden asıl faktör hücre içi  $Ca^{2+}$  yoğunluğunun değişmesidir. Hücre dışı  $Ca^{2+}$  varlığında, hücre içine hızlı  $Ca^{2+}$  alımı bir iyonofor (A23187) yardımıyla gerçekleşir ve bu durum kısa bir sürede AR'yi hızlandırır<sup>10</sup>.

### ***In vitro* AR'NİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

İdeal bir ölçüm yöntemiyle dejeneratif ve normal AR birbirinden ayırdedilebilmelidir<sup>27</sup>. Bu ayrım yalnızca elektron mikroskobu (EM) ile yapılabilir<sup>4</sup> ve EM herhangi bir yeni assay için standart<sup>27</sup> ise de, emek ve zaman gerektirir. Sıklıkla, taze spermada AR faz kontrast (Şekil 1) veya diferensiyel interferens kontrast ile incelenebilir<sup>4</sup> de, akrozom önceden tespit edilmelidir<sup>27</sup>. Faz kontrast nispeten kolay ve bilinen bir metot olmasına rağmen; a) örneklerin kısa sürede incelenme zorunluluğu, b) hücrelerin bazen mikroskop odak düzleminde olmaması ve c) basitçe akrozomun kısmen veya tamamen kaybı AR'nin değerlendirilmesinde yanlış sonuçlara yol açabilir.

Çoğu memelilerde, akrozom çok ince veya nukleusa sıkıca yapışık olduğundan canlı spermatozoonlarda AR'nin tespiti zordur<sup>4</sup>. Nigrosin/eosin boyası<sup>28</sup> ile morfolojik anomaliler ve ölü/canlı oranı bulunabilir<sup>29,30</sup>. Ancak, eosin boyası sadece yarı ölü (moribund) ve ölü hücrelerce alındığından akrozomu özel olarak boyamaz<sup>28</sup>. Daha yaygın strateji ise, akrozomal ve nukleer boyaları birlikte kullanmaktır<sup>27</sup> (örn. Bismark yeşili- rose bengal- trypan mavisi<sup>31</sup> ve Naphthol S sarısı- aniline mavisi<sup>32,33</sup>). Ancak, donma sonrası akrozomal boyanma kalitesi azalmaktadır<sup>33,34</sup>.

Canlı spermatozoa örneğinde, bireysel olarak AR geçirmiş ve motil hücreler hareketsiz olanlardan ayır-

dedilebilir<sup>25</sup>. Ancak, popülasyonu değerlendirmek mikroskop odak düzlemine<sup>35</sup> ve motiliteye<sup>4</sup> bağlı olarak pratik değildir. Ayrıca, canlı boyama teknikleri (Hoechst, propidium iodide) kullanılabilirse de, moribund hücreler sıklıkla boyalara (özellikle Hoechst) karşı geçirgen olmadığından, bazıları canlı/potansiyel fertil olarak sınıflandırılabilir<sup>4</sup>. Gerçekten, cansız ve boya almamış hücre sayısı fazla ise, kullanılan yöntemin güvenilirliği azalabilir<sup>27</sup>. Ayrıca, Fluorescein antibiyotik, Chlortetracycline (CTC) de kapasitasyon sürecinin ve AR'nin izlenmesinde çok hızlı ve seçkin bir ölçüm potansiyeline sahiptir<sup>27</sup>. Ancak; a) kapasitasyon modellerin çokluğu ikiden fazla sınıflandırmaya yol açtığından, sadece tam AR oranını inceleyen araştırmacılarca karmaşık bulunabilir, b) canlı spermatozoonları moribund/özü olanlardan ayırdetmek güçtür, c) CTC fluorescence modellerinin tespit sonrası dayanıklılığı bir kaç saat ile sınırlıdır ve d) boğa ve koçta fluorescence modelleri ile akrozomal morfoloji arasında ilişki bulunmamıştır<sup>27,35</sup>. Üstelik, Fluorescein boyamada akrozomal değerlendirme öncesi spermatozoonun öldürülmesi gerektiğinden, ilgili hücrenin tespit öncesi hareket durumu ve aynı hücrenin tespit sonrası takip zorunluluğu da uygulamalarda ek sınırlamalar getirebilir<sup>4</sup>.

AR geçiren spermatozoonlarda, canlılık tespiti için en iyi yöntem motilite tayini ise de, aktif hareketli hücre popülasyonunda hatta pek çok hareketsiz hücre varlığında AR'yi değerlendirmek zordur. AR sonrası ölüme<sup>23</sup> bağlı oluşan ekvatoryal segment (ES) vezikülasyonu<sup>4</sup> ve post-akrozomal bölge (PAB) dejenerasyonu<sup>33</sup> "canlı-AR tespitini" hemen hemen olanaksız kılar. Dolayısıyla, fizyolojik ve dejeneratif AR'yi morfolojik olarak birbirinden ayırdetmek günümüzde çok güç olduğundan, canlı/özü- AR ayrımı yerine sadece AR oranını değerlendirme yolu tercih edilebilir<sup>32,33</sup>.

### **1.3- *In vitro* AR'NİN İNDÜKSİYONU**

Uygun medyumlarla kapasitasyon indüklenebilir. Başlangıçta kısmen basit kan serumu veya follikül sıvısı kullanılmış, sonraları modifiye Tyrode's ve Krebs Ringer solusyonlarına benzer suni medyumlarda (örn. TALP<sup>32</sup>) spermatozoonların canlı kalabildiği ve kapasite olabildiği bulunmuştur<sup>4</sup>. İndükleyiciler arasında, östrustaki dişinin genital kanalında bulunan heparinbenzeri Glikozaminoglikan'lar (hGAG)<sup>36</sup>, ayrıca heparin<sup>37</sup>, chondroitin sulfate<sup>38</sup>, lysophosphatidylcholine<sup>39</sup> ve A23187<sup>2,40,41</sup> bulunur. Kapasitasyon kriterleri arasında ise  $Ca^{2+}$  alımı, hiperaktif motilite, PM/DAM/akrozomal içerikteki fonksiyonel grupların (örn. lektin bağlayıcı bölgeler, enzimler) kaybolması, spontan AR



ve ZP-penetrasyonu/bağlanması yer alır<sup>4,22,27,35</sup>.

Ek olarak, *in vitro* kapasitasyon için gerekli minimum süre, türe özgü PM'ler arasındaki farklılıklara<sup>4</sup> bağlı olarak 45 dk ile bir kaç saat arasında değişir<sup>32,33,41</sup>. *In vivo* kapasitasyon süresi ise, sığırdaki 6 saat, koyunda 6-7 saat ve atlarda 2-3 saattir<sup>36</sup>. Ancak, ilgili süreler hayvanın fizyolojik durumuna ve kullanılan medyum bileşimine bağlıdır ve kesin olarak belli değildir<sup>4</sup>.

### SPERMA KALİTESİNDE AR'NİN ROLÜ

Farelerde, AR'nin sperm olgunlaşmasının dolaylı bir göstergesi olduğu bildirilmiştir<sup>35</sup>. Benzer şekilde, klasik sperma kalite parametreleri (örn. morfoloji) peri-pubertal (8 aylık) koçlarda normal değerlere yakın iken, A23187 ile indüklenen AR oranının ergin (en az 18 aylık) koçlara göre daha düşük (sırasıyla <% 40 ve >% 60, ort.) olduğu bulunmuştur<sup>42</sup>. Bu durumda, AR testi fertilitenin gelişimini izleme olanağı sağlayabilir. Örneğin, koçta spermatogenesis 4. ayda başlayabilmesine karşın damızlıkta kullanma yaşı 9-16 aydır<sup>43</sup>. Dolayısıyla, AR testi damızlık sürecine başlama veya damızlıktan çıkarma kararı için çok önemli bir kriter olabilir. Ayrıca, boğada motilite ve *in vitro* Ca<sup>2+</sup> akışının da birbiriyle ilişkili<sup>26</sup> olması, *in vitro* AR testinin sperma kalitesindeki önemini vurgulamaktadır.

### SPERMANIN KISA/UZUN SÜRELİ MUHAFAZASININ AR'YE ETKİSİ

Ejakulasyondan sonra, spermatozoonların motil (fertil) özelliğini sadece birkaç (ort. 1-3)<sup>44</sup> gün uzatmak için sulandırılması ve 4°C'de muhafazası gereklidir. Canlılığı yıllarca uzatmak için ise, ısının 0°C'nin altına düşürülmesi zorunludur<sup>45</sup>. Ancak, bu esnada akrozom az veya çok etkilenir. Dolayısıyla, bu işlemler esnada fertilizasyon aşamasındaki spermatozoon için başlıca fizyolojik gereksinimlerden birisi olan AR'nin yer ve zamanının 'ayarlanması'<sup>46</sup> da değişebileceğinden, ilgili muhafaza yöntemlerinin özellikle AR'ye etkileri irdelenecektir.

#### Spermanın kısa süreli soğuk (4°C'de) muhafazasının AR'ye etkisi

Taze spermada kapasitasyon ve AR hızı (AR: ~1-5 dk) türlerarası değişir<sup>4</sup>. Soğutma-ısıtma sonrasında, kapasitasyon taze spermaya göre iki katı daha hızlı olabilir<sup>47</sup>. Kuşkusuz, akrozomal değişiklikler Ca<sup>2+</sup> akışı ve membran lipid faz değişikliklerinden kaynaklanır<sup>4,10,22</sup>. Hücre dışı Ca<sup>2+</sup>, soğutulmuş spermada hücre içi Ca<sup>2+</sup> yoğunluğunu hızla artırır ve akrozomu olumsuz etki-

ler<sup>48,49</sup>. Bu durum, ısı dalgalanması ve A23187 varlığının AR'nin hızlanmasına destekleyici etkilerini gösterir. Dolayısıyla, soğutma işlemi PM geçirgenliğini artırarak önemli akrozomal hasara yol açabilir. Bu durum, hücre dışı Ca<sup>2+</sup> alımını kolaylaştırarak soğutulmuş spermada taze spermaya göre daha erken ve yüksek oranda spontan AR'ye neden olabilir<sup>33</sup>.

Gliserolizasyon da gliserol yoğunluğuna bağlı olarak AR'yi olumsuz etkileyebilir. Çoğu türde, gliserol en başarılı kryoprotektan olup yoğunluğu koruyucu ve toksik etkisi arasındaki uyuma bağlıdır<sup>45</sup>. Örneğin, domuzda PM geçirgenliği >% 2 gliserol yoğunluğunda artar<sup>50</sup>. Benzer şekilde, köpekte maksimum % 2 final gliserol oranı varlığı AR'yi etkilemezken<sup>33</sup>, % 4 gliserol oranı her bir oosite bağlanan hücre sayısını azaltır<sup>51</sup>. Ayrıca, koçta taze spermatozoonların zona-free hamster ovumunu penetrasyon yeteneğinin yoğunluğa (>% 5'te maksimum) ve inkubasyon süresine bağlı olduğu ve gliserolün AR'yi hızlandırdığı bildirilmiştir<sup>52</sup>. Gliserol, önce PM'yi stabilize eder, yıkamada ise destabilize ederek AR/oolemmaya yapışma yeteneğini azaltabilir<sup>53</sup>. Ek olarak, domuzda, ekilibasyon ısısının 4°C'den 0°C'ye düşmesi de PM ve akrozomda kayda değer bir hasara yol açabilir<sup>54</sup>. Kuşkusuz, düşük gliserol yoğunluğunda AR oranındaki değişiklikler de daha az olacaktır. Buna karşın, bazı çalışmalarda taze ve gliserolize edilmiş sperma arasında önemli akrozomal değişiklik gözlenmemiştir<sup>55,56</sup>. Ancak, gliserolizasyon sonrası akrozomal boyanma yeteneği azalabilir<sup>34</sup>. Ayrıca, ekilibasyon taze spermaya göre akrozomda ultrastüktürel olarak belirgin bir değişikliğe yol açmasa da, akrozomal Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT) salınımını artırabilir<sup>57</sup>. Gliserolizasyon öncesi ve sonrası arasında PM bütünlüğü ve akrozomal ultrastrüktür açısından bir fark gözlenemezken, sulandırma ve ekilibasyon arasında fark bulunmuştur<sup>58</sup>.

Dolayısıyla, dondurma öncesi hazırlık işlemlerinin (örn. seminal plazmanın uzaklaştırılması, gliserolizasyon, ekilibasyon) ardından gliserolün ortamdan uzaklaştırılması ve ısıtma (inkubasyon) işlemleri de AR oranını artırabilir.

#### Spermanın uzun süreli dondurarak muhafazasının (-196°C'de) AR'ye etkisi

Burada, öncelikle spermanın uzun süreli muhafazası hakkında genel bilgi verilecek, ardından -196°C'de muhafaza (ve eritme) işleminin AR'ye etkisi irdelenecektir.



içi  $Ca^{2+}$  regülasyon yeteneğini etkileyebilir. Buna karşın, insan<sup>74</sup> ve köpekte<sup>33</sup> AR açısından dondurma işlemi ile A23187 yoğunluğu arasında bir ilişki bulunamamıştır. Her ne kadar, dondurulmuş insan spermatozoonlarında taze olanlara göre daha az oranda spontan AR oluşmuşsa da, A23187'ye tepkilerinde benzerlik gözlenmiş, bu nedenle eritme sonrası spermatozoonların A23187'nin indükleyici etkilerine normal AR geçirdikten sonra yenik düştüğü değerlendirilmiştir<sup>74</sup>. Dolayısıyla, taze ve özellikle dondurulmuş-eritilmiş spermada AR'nin oluşum sürecinin türlerarası değiştiği kanısına varılmıştır.

Kuşkusuz, ultrastrüktürel açıdan *in vitro* AR'nin değerlendirilmesi, soğutulmuş veya dondurulmuş-eritilmiş spermatozoonlardaki akrozomal değişiklikler hakkında daha ayrıntılı bilgiler sağlar. Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelemede, sağlam akrozomlar kabaca gözlemlenebilirse de, küçük değişiklikleri düşük çözünürlükten dolayı tespit etmek çok güçtür<sup>33</sup>. Buna karşın, Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) ile, başta AR esnasında veya eritme sonrası ilk membran değişiklikleri olmak üzere, hücresel alt yapı kısımları daha ayrıntılı olarak incelenebilir<sup>4,27,33</sup>. Ancak, AR'nin nedenleri (normal/anormal) arasında bir ayırım yapmak çok zordur. Çünkü, anormal AR zayıf tespit, soğuk şoku, yaşlanma (dondurma-eritme), hücresel hasar/ölüme bağlı olabilir<sup>4,27</sup>.

Taze/soğutulmuş spermatozoonlar arasında belirgin bir akrozomal farklılık bulunamazken (SEM ile), eritme sonrası akrozomların yaklaşık tamamında şişme veya nadiren kopma oluşabilir<sup>33,57,75</sup>. Ancak, donma-eritme sonrası yüksek oranda görülen akrozomal hasar eritme/sonraki hazırlık (örn. ST için) işlemlerine bağlı olabilir<sup>70,76</sup>. Gerçekten, koçta, donma-eritmeye bağlı oluşan membran hasarı sadece 2-30°C arası ısıtımada gözlenmiştir<sup>77</sup>. Bununla birlikte, akrozomal şişme, AR'nin ilk aşamalarından birisi olduğundan fertilizasyon yeteneğini etkilememesi gerekir<sup>78-80</sup>. Kuşkusuz, PM'deki veya akrozomal şişmenin azaltılmasıyla, tüm baş kısmının bütünlüğü de korunmuş olacaktır.

SEM ile dondurma öncesi/sonrası spermatozoonlarda *in vitro* AR incelendiğinde, donma öncesi hücrelerin hemen hepsinde ES ve PAB sağlam kalırken, eritme sonrası AR geçirmiş hücrelerin PAB'sinde önemli değişiklikler (azalmış/dağınık koyuluk, düzensiz yüzey ve bitişik partiküller) olduğu gözlenir<sup>33,81</sup>. TEM ile incelemede ise; PM ile DAM arasında tekli/çoklu yapışma, vezikülleşme, şişme ve yoğun akrozomal içerikte azalma/kayıp görülür. Akrozomal şiş-

me, normalde AR esnasında sağlam kalan ES'yi etkilemese de, AR'den sonra zamanla ES vezikülleşebilir ve kaybolabilir<sup>4</sup> ki, bu da hücre ölümüne yol açar<sup>23</sup>. Kuşkusuz, bu gibi değişiklikler genellikle dondurulmuş (özellikle tam AR geçirmiş) hücrelerde gözlenir<sup>33</sup>. Ayrıca, PM ve DAM kimyasal etkilere (örn. tespit) karşı kapasite olmamış hücrelere göre daha hassas olabilir<sup>4</sup>. Ek olarak, AR sonrası membranların kesintiye uğraması/kayıbı sözkonusudur. Dolayısıyla, sadece dondurma-eritme işleminin akrozoma etkisinin incelenmesiyle eritme sonrası hücrelerde *in vitro* AR gelişimine ancak kısmen ışık tutabilir.

Dondurma-eritme sonrasında ve A23187 yokluğunda, sağlam akrozomlu ve kısmen spontan AR geçirmiş bazı spermatozoonlarda, nukleus membranının (NM) kırılarak ES'nin hemen üst kısmında geniş boşluklar oluşabilir<sup>33</sup>. Çoğu türde (örn. boğa), burası PM ve DAM'nin en az dayanıklı bölgesi<sup>82</sup> olduğundan, bu durum normaldir. Ayrıca, bu bölgedeki DAM'nin  $Ca^{2+}$  bağlayıcı özelliği çok fazladır<sup>83</sup>. Dolayısıyla, dondurma-eritme işlemi,  $Ca^{2+}$  içeren ortamda, büyük olasılıkla PM geçirgenliğini artırarak AR'yi daha da ilerletebilir. Benzer şekilde, dondurulmuş-eritilmiş spermada AR geçirmiş (A23187 ile) hücrelerde de NM bütünlüğü bozulabilir<sup>33</sup>. Kuşkusuz, NM AR- esnası/sonrası donma hasarına karşı daha hassas duruma gelecektir. Kromatin yapısı değişiklikleri ve kromozomal dekonduksiyon belirtileri sıklıkla spermiogenesis esnasındaki aksaklıklar ve NM hasarıyla ilişkilidir<sup>84</sup>. Gerçekten, spermatozoonların dondurma-eritme sonrası sülfür ve fosfor yoğunlukları da azalarak kromatin değişikliklerine (olası DNA hasarı) yol açtığı bildirilmiştir<sup>80</sup>. Dolayısıyla, dondurma işlemi kromatin yapısı dayanıklılığını azaltarak spermatozoonların fertilizasyon yeteneğini zayıflatabilir<sup>85</sup>.

Hücrenin ölümü, hücrede yapısal değişikliklere neden olur<sup>4,23</sup>. Bu durumda, eritme sonrası tam AR geçiren (A23187 ile) spermatozoonların hemen hepsinde ES ve PAB değişikliğe uğrar<sup>33</sup>. AR sonrası ES (fertilizasyonda oolemmaya yapışan bölge)<sup>86</sup> bütünlüğü bozulabilir<sup>4</sup>. Dolayısıyla, bu organellerde görülen aşırı hasarın, donmuş spermayla yapılan ST sonrası düşük fertilitenin asıl nedenlerinden birisi olabileceği değerlendirilmektedir.

Sonuç olarak, dondurma-eritme işleminin AR'yi hızlandırarak ES ve PAB'de ek hasara yol açtığı ve ultrastrüktürel çalışmalarda TEM'nin SEM'ye tercih edilmesi gerektiği kanısına varılmıştır. Dolayısıyla, gelecekte tüm spermatozoon bütünlüğünü koruyucu dondurma ve özellikle 'optimum' eritme tekniklerinin geliştirilmesi gerekir.



## SUNİ TOHURLAMA BAŞARISINDA (FERTİLİTE) AR'NİN ROLÜ

Dondurulmuş boğa spermasında, sadece morfolojik olarak 'sağlam' akrozom varlığının ST fertilitesi ile önemli bir ilişkisi olmadığı gözlenmiştir<sup>87</sup>. Ancak, klasik sperm fonksiyon testleri (ZP-bağlanma testi, *in vitro* AR testi, IVF)<sup>88</sup> arasında AR testinin sperma kalitesinin belki de en kritik göstergesi olduğu bildirilmiştir<sup>2</sup>.

Boğa spermasında, indükleyici maddeye (örn. chondroitin sulfat<sup>38</sup>, heparin<sup>37</sup> ve A23187<sup>2</sup>) bakılmaksızın, *in vitro* AR oranı ile *in vivo* fertilite arasında çok önemli ve yüksek düzeyde paralel bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca, insanda düşük fertiliteye sahip erkeklerde *in vitro* AR (A23187 ile) oranının fertil erkeklerle göre daha düşük olduğu gözlenmiştir<sup>89</sup>. Ek olarak, A23187 ile yapılan AR testinin, chondroitin sulfat ve heparin'e göre daha iyi düzeyde bir tekrar edilebilirlik özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir<sup>2</sup>. Bu durumda, damızlık adaylarının daha az sayıda sperma örneği AR açısından incelenerek ilgili hayvanın kullanılabilir bir fertilite tahmini yapılabilir. Gerçekten, son zamanlarda sperm fonksiyon testleri arasında *in vitro* AR geçirme yeteneğinin IVF işleminde kritik bir safha olduğunun bulunmasının ardından, AR testinin damızlık hayvanlarda saha fertilitesinin tahmini amacıyla kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır<sup>90</sup>. Üstelik, sözkonusu testin (özellikle A23187 ile) ST istasyonları için son derece pratik, basit ve nispeten ucuz olması<sup>2</sup> ve çoğu türde (örn. koç<sup>41</sup>, aygır<sup>40</sup>) uygulanabilirliği de dikkate alındığında, gelecekte damızlık adaylarının fertilite tahmini için gerçekten umut verici bir seçenek olabileceği kanısına varılmıştır.

## SONUÇ

Sunulan bilgilere göre, *in vitro* AR testi başlıca; 1) bir erkeğin fertilite potansiyelinin tayini ve *in vitro* fertilite düşüklüğünün belirlenmesinde, 2) fertilite gelişiminin izlenmesinde, 3) kapasitasyonun incelenmesinde, 4) spermatozoal baş hasarının (örn. dondurma-eritme sonrası) tespitinde ve 5) IVF kültür şartlarının iyileştirilmesinde önemli katkılar sağlayabilir.

## KAYNAKLAR

- 1 **Watson PF:** The preservation of semen in mammals. In, Finn CA (Ed): Oxford Reviews of Reproductive Biology. Vol I: 283-350, Oxford Univ Press, GB, 1979.
- 2 **Whitfield CH, Parkinson TJ:** Assessment of fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrosome reactions with calcium ionophore A23187. *Theriogenology*, 44: 413-422, 1995.
- 3 **de Kretser DM, Kerr JB:** The cytology of the testis. In, Knobil E, Neill JD (Eds): The Physiology of Reproduction. 2nd ed. 1177-1290, Raven Press, Ltd. New York, USA, 1994.
- 4 **Yanagimachi R:** Mammalian fertilization. In, Knobil E, Neill JD (Eds): The Physiology of Reproduction. 2nd ed. 189-317, Raven Press, Ltd, New York, USA, 1994.
- 5 **Tulsiani DRP, Abou-Haila A, Looser CR, Pereira BMJ:** The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res*, 240: 151-164, 1998.
- 6 **McLeskey SB, Dowds C, Carballada R, White RR, Saling PM:** Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int Rev Cytol*, 177: 57-113, 1997.
- 7 **Brewis JA, Morton IE, Moore HDM, England GCW:** Solubilised zona pellucida and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 24: 41(Abstr), 1999.
- 8 **Tesarik J:** Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human spermatozoa populations of proven fertilising ability *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 74: 383-388, 1985.
- 9 **Purohit SB, Laloraya M, Paradeep Kumar G:** Acrosome reactions in repulsive strain and hydration barriers in human sperm membranes. *Biochem Mol Biol Int*, 45: 227-235, 1998.
- 10 **Fraser LR:** Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reprod*, 13, Suppl 1: 9-19, 1998.
- 11 **Bedford JM:** Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod*, Suppl 2: 128-158, 1970.
- 12 **Wassarman PM, Albertini DF:** The mammalian ovum. In, Knobil E, Neill JD (Eds): The Physiology of Reproduction. 2nd ed. 79-122, Raven Press, Ltd. New York, USA, 1994.
- 13 **Florman HM, Babcock DF:** Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. In, Wassarman PM (Ed): Elements of Mammalian Fertilization. Vol I: 105-132, CRC Press, Inc. Boca Raton, USA, 1991.
- 14 **Amann RP, Hammerstedt RH, Veeramachaneni DNR:** The epididymis and sperm maturation: A perspective. *Reprod Fert Dev*, 5: 361-381, 1993.
- 15 **Toshimori K:** Maturation of mammalian spermatozoa: Modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res*, 293: 177-187, 1998.
- 16 **Yeung CH, Pérez-Sánchez F, Soler C, Poser D, Kliesh S, Cooper TG:** Maturation of human spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction. *Human Reprod Update*, 3(3): 205-213, 1998.
- 17 **Jones RC, Murdoch RN:** Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. *Reprod Fert Dev*, 8: 553-568, 1996.
- 18 **Austin CR:** Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res B*, 4: 581-596, 1951.
- 19 **Chang MC:** Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* (Lond), 168: 697-698, 1951.
- 20 **Austin CR:** The 'capacitation' of the mammalian spermatozoa. *Nature* (Lond), 170: 326, 1952.
- 21 **Jaiswal BS, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Eisenbach M:** Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Letters*, 427: 309-313, 1998.
- 22 **Cohen-Dayag A, Eisenbach M:** Potential assays for sperm capacitation in mammals. *Am J Physiol*, 267 (Cell Physiol, 36): C1167-C1176, 1994.
- 23 **Harrison RAP:** Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fert Dev*, 8: 581-594, 1996.
- 24 **Yanagimachi R, Usui N:** Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa.



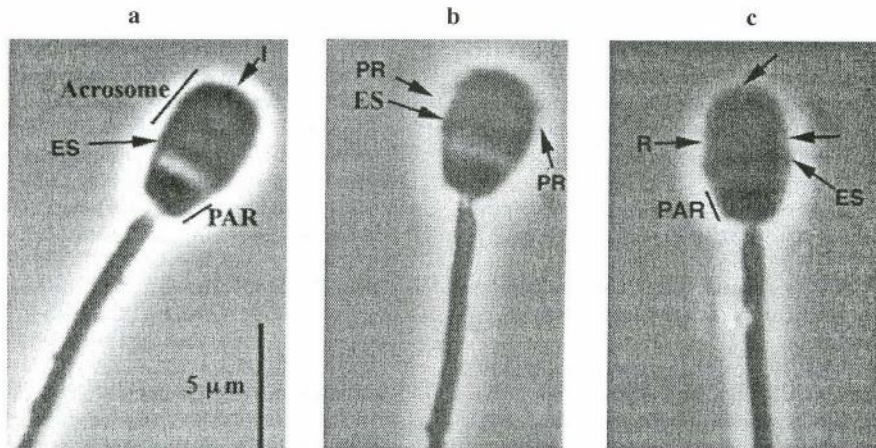
- Exp Cell Res*, 89: 161-174, 1974.
- 25 **Mahi CA, Yanagimachi R:** Capacitation, acrosome reaction, and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. *Gamete Res*, 1: 101-109, 1978.
  - 26 **Bailey JL, Robertson L, Buhr MM:** Relationship among in vivo fertility, computer-analysed motility and in vitro  $Ca^{2+}$  flux in bovine spermatozoa. *Can J Anim Sci*, 74: 53-58, 1994.
  - 27 **Cross NL, Meizel S:** Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod*, 41: 635-641, 1989.
  - 28 **Campbell RC, Dott HM, Glover TD:** Nigrosin Eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *Agr Sci*, 48(1): 1-8, 1956.
  - 29 **Barth AD, Oko RJ:** Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. 8-18, Iowa State Univ Press, Ames, USA, 1989.
  - 30 **Öztürkler Y, Baran A, Evecen M, Ak K, İleri İK:** Comparison of ovine spermatozoal morphological features after staining or fixation and assessment of morphological abnormalities in dead/live spermatozoa. *Turk J Vet Anim Sci*, 25: 675-680, 2001.
  - 31 **Talbot P, Chacon RS:** A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human spermatozoa. *J Exp Zool*, 215: 201-208, 1981.
  - 32 **Christensen P, Whitfield CH, Parkinson TJ:** The use of bright-field microscopy in evaluating bovine acrosome reaction. *Theriogenology*, 42: 655-662, 1994.
  - 33 **Uçar Ö:** Acrosome reaction and cryopreservation of dog spermatozoa. PhD thesis. Univ Bristol, Bristol, UK, 2000.
  - 34 **Watson PF:** Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec*, 97: 12-15, 1975.
  - 35 **Cardullo RA, Florman HM:** Strategies and methods for evaluating acrosome reaction. *Method Enzymol*, 225: 136-153, 1993.
  - 36 **İleri İK:** Fertilizasyon. In: İleri İK, Ak K, Pabuçcuoğlu S, Usta S (Eds): Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. 31-37, İstanbul Üniv Vet Fak Yayını. Ders Notu No: 133, İstanbul, 2002.
  - 37 **Whitfield CH, Parkinson TJ:** Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology*, 38: 11-20, 1992.
  - 38 **Ax RL, Dickson K, Lenz RW:** Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to the nonreturn rate of dairy bulls. *J Dairy Sci*, 68: 387-390, 1985.
  - 39 **Gómez MC, Catt JW, Gillan L, Evans G, Maxwell WMC:** Effect of culture, incubation, and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fert Dev*, 9: 665-673, 1997.
  - 40 **Christensen P:** Evaluation of equine spermatozoa: The use of transmission electron microscopy and in vitro acrosome reaction. PhD thesis. Royal Vet & Agr Univ, Copenhagen, Denmark, 1995.
  - 41 **Uçar Ö, Parkinson TJ:** In vitro induction of the acrosome reaction in ovine spermatozoa by calcium ionophore A23187. *Acta Vet Hung*, 51(1): 103-109, 2003.
  - 42 **Uçar Ö, Parkinson TJ:** Koç spermasında kalsiyum iyonofor A23187 ile indüklenen akrozom reaksiyonu üzerine yaşın etkisi (yayınlanmamış gözlem).
  - 43 **Ak K:** Koyunlarda reprodüksiyon ve sun'i tohumlama. In: İleri İK, Ak K, Pabuçcuoğlu S, Usta S (Eds): Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. 189-205. İstanbul Üniv Vet Fak Yayını. Ders Notu No: 133, İstanbul, 2002a.
  - 44 **Ak K:** Spermanın sulandırılması. In: İleri İK, Ak K, Pabuçcuoğlu S, Usta S (Eds): Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. 94-99. İstanbul Üniv Vet Fak Yayını. Ders Notu No: 133, İstanbul, 2002b.
  - 45 **Watson PF:** Artificial insemination and preservation of semen. In: Lammig GE (Ed): Marshall's Physiology of Reproduction: 4th ed. Vol II: 747-869, Churchill Livingstone, Edinburgh, GB, 1990.
  - 46 **Tesarik J:** Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Human Reprod*, 4(8): 957-961, 1989.
  - 47 **Rota A:** Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. PhD thesis. Swedish Univ Agr Sci, Uppsala, Sweden, 1998.
  - 48 **Bailey JL, Buhr MM:** Regulation of internal  $Ca^{2+}$  by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology*, 32: 259-269, 1995.
  - 49 **Zhao Y, Buhr MM:** Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge. *J Androl*, 16: 278-285, 1995.
  - 50 **Bower RE, Crabo BG, Pace MM, Graham EF:** Effects of dilution and glycerol on the release of glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) from boar spermatozoa. *J Anim Sci*, 36: 319-324, 1973.
  - 51 **Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL:** Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J Reprod Fertil, Suppl* 51: 99-108, 1997.
  - 52 **Slavík T:** Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. *J Reprod Fertil*, 79: 99-103, 1987.
  - 53 **Murdoch RN, Jones RC:** The effects of glycerol on the metabolism and ultrastructure of boar spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 54: 419-422, 1978.
  - 54 **Plummer JM, Watson PF:** The quantitative ultrastructural assessment of head membrane damage in boar spermatozoa subjected to varying degrees of cold shock. *Anim Reprod Sci*, 16: 265-275, 1988.
  - 55 **Watson PF, Martin ICA:** A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 28: 99-101, 1972.
  - 56 **Coulter GH, Foote RH:** The motility, acrosomal morphology and oxygen uptake of bull spermatozoa during processing and after freezing in straws. *AI Digest*, 12-15, 1974.
  - 57 **Chauhan MS, Kapila R, Gandhi KK, Anand SR:** Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Andrologia*, 26: 21-26, 1994.
  - 58 **Ortman K, Rodriguez-Martinez H:** Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. *J Vet Med A*, 41: 37-47, 1994.
  - 59 **Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson A:** Cryopreservation of oocytes and embryos. In: Trounson A, Gardner DK (Eds): Handbook of In Vitro Fertilization. 213-236, CRC Press, Inc, USA, 1993.
  - 60 **Polge C:** Low temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proc Royal Soc Lond*, 147: 488-508, 1957.
  - 61 **Mazur P:** Stopping Biological Time. The freezing of living cells. *Ann NY Acad Sci*, 541: 514-531, 1988.
  - 62 **Watson PF:** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev*, 7: 871-891, 1995.
  - 63 **Mazur P:** Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 247: 125-142, 1984.
  - 64 **Grout BWW, Morris GJ:** Freezing and cellular organization. In: Grout, BWW, Morris GJ (Eds): The Effects of Low Temperatures on Biological Systems. 147-173, Edward Arnold (Publ) Ltd, London, 1987.
  - 65 **Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP:** Cryopreservation of mammalian sperm: what can we ask them to survive. *J Androl*, 11(1): 73-88, 1990.
  - 66 **Foote RH:** Extenders for freezing dog semen. *Am J Vet Res*, 25: 37-39, 1964.
  - 67 **Trummer H, Tucker K, Young C, Kaula N, Meacham RB:** Effect of storage temperature on sperm cryopreservation. *Fertil Steril*, 70: 1162-1164, 1998.
  - 68 **Mazur P:** The Freezing of Biological Systems. The responses of living cells to ice formation are of theoretical interest and practical concern. *Science*, 168: 939-949, 1970.



- 69 **Graham EF, Crabo BG, Pace MM:** Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J Anim Sci, Suppl* 11: 80-118, 1978.
- 70 **Woolley DM, Richardson DW:** Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *J Reprod Fertil*, 53: 389-394, 1978.
- 71 **Healey P:** Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. *J Reprod Fertil*, 18: 21-27, 1969.
- 72 **Gillan L, Evans G, Maxwell WMC:** Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fert Dev*, 9: 481-487, 1997.
- 73 **Bailey JL, Buhr MM:** Ca<sup>2+</sup> regulation by cryopreserved bull spermatozoa in response to A23187. *Cryobiology*, 30: 470-481, 1993.
- 74 **McLaughlin EA, Ford WC, Hull MGR:** Effects of cryopreservation on the human sperm acrosome and its response to A23187. *J Reprod Fertil*, 99: 71-76, 1993.
- 75 **Hofmo PO, Andersen Berg K:** Electron microscopic studies of membrane injuries in blue fox spermatozoa subjected to the process of freezing and thawing. *Cryobiology*, 26: 124-131, 1989.
- 76 **Courtens JL, Paquignon M:** Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar. In: Johnson LA, Larsson K (Eds): Proceedings 1st Int Conf Deep Freezing Boar Semen. 61-87, Swedish Univ Agr Sci, Uppsala, Sweden, 1985.
- 77 **Holt WV, Head MF, North RD:** Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing. *Biol Reprod*, 46: 1086-1094, 1992.
- 78 **Jones RC, Stewart DL:** The effects of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 56: 233-238, 1979.
- 79 **Mahadevan M, Trounson AO:** Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fertil Steril*, 41: 287-293, 1984.
- 80 **Ström Holst B, Rota A, Andersen Berg K, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H:** Canine sperm head damage after freeze-thawing: Ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod Dom Anim*, 33: 77-82, 1998.
- 81 **Krogenæs A, Andersen Berg K, Hafne AL, Engeland E:** Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. *Acta Vet Scand*, 35: 17-26, 1994.
- 82 **Gaddum-Rosse P, Blandau RJ:** Comparative studies on the proteolysis of fixed gelatin membranes by mammalian sperm acrosomes. *Am J Anat*, 134: 133-144, 1972.
- 83 **Watson PF, Plummer JM:** Relationship between calcium binding sites and membrane fusion during the acrosome reaction induced by ionophore in ram spermatozoa. *J Exp Zool*, 238: 113-118, 1986.
- 84 **Küpker W, Schulz W, Diedrich K:** Ultrastructure of gametes and intracytoplasmic sperm injection: The significance of sperm morphology. *Human Reprod* 13, Suppl 1: 99-106, 1998.
- 85 **Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, Lansac J:** Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human spermatozoa. *Int J Androl*, 14: 328-332, 1991.
- 86 **Bedford JM, Moore HDM, Franklin LE:** Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp Cell Res*, 119: 119-126, 1979.
- 87 **Cumming IR:** Suitability of the intact acrosome method for the prediction of fertility in bovine artificial insemination. *Vet Rec*, 136: 289-291, 1995.
- 88 **Uçar Ö:** Boğalarda sperma kalitesinin suni tohumlama açısından önemi. KAÜ Vet Fak, 2002 Yılı- Bahar Yarıyılı Seminer Programı, Kars. 2 Mayıs, 2002.
- 89 **Liu DY, Baker HWG:** Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates with teratozoospermic semen. *Human Reprod*, 13: 905-910, 1998.
- 90 **Parkinson TJ:** Fertility and infertility in male animals. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW (Eds): Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8th ed. 695-750, WB Saunders, London (printed in China), 2001.

*Yazışma adresi (Correspondence address)*

Yrd.Doç.Dr. Ömer UÇAR  
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı  
36100 KARS, TÜRKİYE  
Tel: +90 474 2426801-1276 Fax: +90 474 2426853  
E-mail: oucar6975@hotmail.com



**Şekil 1.** Taze köpek spermasında A23187 ile *in vitro* akrozom reaksiyonu (faz kontrast mikroskopu ile)<sup>33</sup>.  
**Plate 1.** *In vitro* acrosome reaction by A23187 in fresh dog-semen (by phase contrast microscopy)<sup>33</sup>.

- (a) I: Sağlam akrozom, ES: ekvatoryal segment, PAR: Post-akrozomal bölge. (b) PR: Kısmi reaksiyon. (c) R: Tam reaksiyon  
(a) I: Intact acrosome, ES: Equatorial segment, PAR: Post-acrosomal region. (b) PR: Partial reaction. (c) R: Complete reaction