

KOÇ SPERMASININ FARKLI ANTİOKSİDANLAR İÇEREN SULANDIRICILARLA KISA SÜRELİ SAKLANMASI¹

Savaş YILDIZ*

Ali DAŞKIN**

Yayın Kodu: 2004/45-A(Tez)

Özet: Bu çalışma ile, koç spermasının kısa süreli (+5°C'de) saklamasında sulandırıcıya farklı antioksidanlar katarak spermatozoanın motil kalma süresi ve fertil ömrünün uzatılması amaçlanmıştır.

Sperma 4 adet Akkaraman ırkı koçtan düzenli olarak haftada iki kez olmak üzere suni vagen yöntemi ile alınmıştır. Çalışmada ana sulandırıcı olarak kullanılan tris-sitrik asit-glukoz-yumurta sarısı sulandırıcısına ergothionin (0.03 mg/ml), seminal plazma (1 ml), askorbik asit (10 mM), süperoksit dismutaz (800 IU/ml) ayrı ayrı olmak üzere ve bu maddelerin belirtilen miktarlardaki kombinasyonu ilave edilerek 5 farklı sulandırıcı grubu elde edilmiştir. Kontrol grubu olarak ise antioksidan ilave edilmemiş tris - sitrik asit - glukoz - yumurta sarısı sulandırıcısı kullanılmıştır. Eşit hacimlerde bölünen miks ejakülatlar 1:5 oranında sulandırılmıştır.

Sulandırılan spermalarda motilite, ölü spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranı ve pH parametreleri 0. saatten 72. saate kadar 12 saat aralıklarla değerlendirilmiş ve kaydedilmiştir. En yüksek ortalama motilite ve en düşük ölü ve anormal spermatozoa oranları 72. saat sonunda kombine ve ergothionin sulandırıcı gruplarında elde edilirken; en düşük motilite, en yüksek ölü ve anormal spermatozoa oranları seminal plazma sulandırıcı grubunda elde edilmiştir. Çalışmanın 0-72. saatleri arasında tüm spermatozojik parametreler için grup ortalamaları arasında anlamlı düzeyde fark olduğu tespit edilmiştir (P<0.001).

Sonuç olarak, koç spermasının kısa süreli saklanmasında sulandırıcıya katılan antioksidanlardan ergothionin ve araştırmada kullanılan antioksidanlardan oluşturulmuş kombine sulandırıcısının diğer sulandırıcılara göre daha başarılı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Koç, sperma, kısa süreli saklama, serbest oksijen radikalleri, antioksidan.

Liquid Storage of Ram Semen with Extenders that Containing Different Antioxidants

Summary: This study was aimed at the prolongation of the periods in which ram spermatozoa remains motile and fertile by means of addition of various antioxidants to the diluent used for short term preservation of ram sperma at +5°C.

Sperma was regularly collected from 4 Akkaraman breed rams twice a week by using an artificial vagina. Ergothionin (0.03 mg/ml), seminal plasma (1 ml), ascorbic acid (10 mM) and superoxide dismutase (800 IU/ml) were added separately to the main diluent of the study which contained tris - citric acid - glucose - egg yolk. Together with a combination including the aforementioned additives at the stated amounts, 5 different diluent groups were formed. The diluent containing tris-citric acid-glucose-egg yolk was used as control. Mixed ejaculates were separated into equal volumes and diluted at a proportion of 1:5.

Examination with regard to parameters including motility, the rates of nonviable and abnormal spermatozoa and pH values was performed at 12 hour intervals between hours 0 and 72. At the end of the 72nd hour, the highest mean rate of motility and the lowest rate of nonviable and abnormal spermatozoa were detected in the groups in which the combination and ergothionin were used. On the other hand, the lowest mean rate of motility and the highest rate of nonviable and abnormal spermatozoa were determined in the group in which seminal plasma was administered. Differences between mean group values with regard to each spermatological parameter, between hours 0 and 72, were found to be statistically significant (p<0.001).

In conclusion, among various antioxidants added to the diluent, used for short term preservation of ram sperma, ergothionin and the combination were determined to give better results.

Keywords: Ram, sperma, Sshort term storage, free oxygen radicals, antioxidant.

GİRİŞ

Spermanın kısa süreli saklanması sırasında spermatozoa lipid peroksidasyonuna maruz kalabilmektedir. Lipid peroksidasyonu spermatozoanın disfonksiyonunda rol oynayan en önemli etkenler arasındadır²⁻⁴. Spermatozoanın serbest oksijen radikalleri ve onların neden olduğu lipid peroksidasyonuna oldukça duyarlı olmasının nedeni, spermatozoa plazma membranının doymamış yağ asitleri bakımından oldukça zengin bir yapıya sahip olmasıyla açıklanmaktadır. Serbest oksijen radikalleri, spermatozoa membranında yaptığı değişikliklerle akışkanlığı etkiler ve

dejeneratif bir etki oluşturur. Çünkü membrandaki akışkanlığı sağlayan esas öge, plazma membranında bulunan doymamış yağ asiti içeriğidir. Lipit peroksidasyonunun çok düşük oranda oluşması bile membran akışkanlığında ani bir azalmaya neden olur. Böylece, akrozom reaksiyonu ve yumurta katmanlarının penetrasyonu engellenir⁵⁻¹⁰.

Peroksidasyonun bir sonucu olarak plazma membranı içerisinde yüksek ve düşük akışkanlığa sahip multifazik bölgelerin yaratılması fosfolipaz A₂ enziminin aktivasyonuna neden olur. Fosfolipaz A₂ enziminin aktivasyonu sonucu da membranda yağ asitleri-

¹ Aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

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

** Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

nin kaybı ve lipid tabakasının organizasyonu üzerine zararlı etkileri olan lisofosfolipidlerin ortaya çıktığı görülür. Tüm bu faktörlerin bir araya gelmesiyle peroksidatif hasar membran üzerinde lateral olarak yayılır ve spermatozoonların motilite ve canlılığında önemli kayıplar görülür^{3,5,6,11-13}.

Aerobik ve hatta yarı aerobik ortamlarda dahi reaktif oksijen türlerinin üretilmesi kaçınılmazdır. Kısa süreli saklamada ağız kapatılmış olan tüp içerisinde tutulan spermanın yüzeyi ile tüpün ağız kısmı arasında bulunan oksijen aerobik metabolizmanın oluşabilmesi için yeterlidir^{5,14-16}.

Memeli hayvanların vücut sıvıları ve reproduktif dokularında da yüksek konsantrasyonlarda bulunan antioksidan maddeler, eksojen olarak sperma sulandırıcılarına katıldığında spermadaki reaktif oksijen türlerinin neden olduğu, hücre membranındaki doymamış yağ asitleri ve fosfolipitlerin peroksidasyonunu minimuma indirmektedir. Böylece lipid peroksidasyonunun spermatozoa akrozomunda neden olduğu hasar azaltılabilmekte ve dolayısıyla elde edilen döl verimi önemli ölçüde yükseltilebilmektedir^{11,15,17-19}.

Son yıllarda seminal plazmada yüksek konsantrasyonlarda doğal olarak bulunan taurin, hypotaurin, inositol, prolin, SOD, katalaz, BHT, desferal, askorbik asit, alfa-tokoferol gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir. Araştırmacılar bu amaçla antioksidanları sperma sulandırıcılarına katarak spermaların kısa ve uzun süreli muhafazasında kullanmışlar ve başarılı sonuçlar almışlardır²⁰⁻²⁷.

Bu çalışma ile, koç spermasının kısa süreli (+5°C'de) saklamasında sulandırıcıya farklı antioksidanlar katarak spermatozoanın motil kalma süresi ve fertil ömrünün uzatılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan 4 adet Akkaraman ırkı koç kullanıldı. Spermalar 4 koçun her birinden 10'ar ejakülat olmak üzere haftada iki kez sun'i vagen yöntemi ile alındı. Alınan miks ejakülatlarda öncelikle miktar, motilite, ölü/canlı spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranı, yoğunluk ve pH parametreleri belirlenerek kaydedildi.

Spermaların sulandırılmasında ana sulandırıcı ola-

rak; tris, sitrik asit, glukoz, yumurta sarısı sulandırıcı kullanıldı.

Spermaların sulandırılmasında kullanılan ana sulandırıcının formülü:

| | |
|-------------|--------|
| Trisma Base | 3.63 g |
| Sitrik asit | 1.82 g |
| Glukoz | 0.5 g |

* Distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak Tris-Sitrat-Glukoz sulandırıcısı hazırlandı. Yumurta sarısı sulandırıcıya % 20 oranında ilave edildi.

Yukarıda açık formulasyonu verilen sperma sulandırıcısı eşit hacimde olacak şekilde 6 adet deney tüpüne bölündükten sonra, sperma sulandırıcılarına ergothionin (0.03 mg/ml), seminal plazma (1 ml), askorbik asit (10 mM), süperoksit dismutaz (SOD) (800 IU/ml) ve bu maddelerin belirtilen miktarlardaki kombinasyonu ilave edilerek 5 farklı sulandırıcı grubu elde edildi. Kontrol grubu sulandırıcısı olarak ise tris, sitrik asit, glukoz, yumurta sarısı sulandırıcısı kullanıldı. Sulandırmalar 1:5 oranında yapıldı.

Sulandırıcı Grupları

- I. Grup:** Tris Sul. + 0.03mg/ml Ergothionin
- II. Grup:** Tris Sul. + 0.03 mg/ml Ergothionin + 800IU/ml SOD + 10mM Askorbik asit + 1 ml Seminal plazma
- III. Grup:** Tris sul. + 800 IU/ml SOD
- IV. Grup:** Tris sul + 10 mM Askorbik asit
- V. Grup:** Tris sul. + 1 ml Seminal plazma
- Kontrol Grubu:** Tris Sulandırıcısı

Sulandırılan spermalarda motilite, ölü/canlı spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranı ve pH parametreleri 0. saatten 72. saate kadar 12 saat aralıklarla değerlendirildi ve kaydedildi. Sperma numuneleri, çalışma süresi boyunca buzdolabı ısısında (+5°C'de) saklandı.

İstatistiksel analiz: Değişkenler ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arasında farklılık olup olmadığını anlamak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Analiz sonucunda farklılık bulunduğu, farklılığı yaratan grupları belirlemek için DUNCAN ikili karşılaştırma testi yapıldı. Her bir gruptaki saatler arası farkların karşılaştırılmasında tekrarlı ölçümlerde varyans analizi uygulandı.

BULGULAR

Araştırmada elde edilen sonuçlar Tablo1' de gösterilmiştir.

Tablo 1. Sıfır ile 72. saatler arasında elde edilen ortalama spermatozojik parametre değerleri.
Table 1. The average spermatologic paramaters that achieved between hours 0 and 72.

| 72. saat $\bar{X} \pm Sx$ | pH | 6.20±0.30 | 6.31±0.17 | 6.16±0.28 | 6.28±0.10 | 6.22±0.06 | 6.22±0.30 | - |
|------------------------------|----------------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------------------|
| 72. saat $\bar{X} \pm Sx$ | Anormal Spz. Oranı | 31.70±4.08 | 29.25±10.19 | 25.30±6.10 | 28.50±4.54 | 30.33±5.81 | 33.95±4.13 | * |
| | Ölü/Canlı Spz. Oranı | 39.30±5.68 | 31.30±5.51 | 31.03±6.79 | 34.40±5.34 | 34.48±6.42 | 40.38±6.17 | ** |
| 72. saat $\bar{X} \pm Sx$ | Motilite | 27.00±8.23 | 42.00±12.95 | 42.00±7.89 | 34.00±10.75 | 35.00±11.49 | 26.00±6.99 | *** |
| | | a | b | b | ab | ab | a | |
| 60. saat $\bar{X} \pm Sx$ | pH | 6.31±0.23 | 6.35±0.16 | 6.24±0.18 | 6.39±0.14 | 6.25±0.16 | 6.36±0.6 | - |
| | Anormal Spz. Oranı | 27.48±4.14 | 23.43±8.80 | 20.60±5.19 | 23.55±4.89 | 26.00±5.50 | 27.95±4.84 | * |
| 60. saat $\bar{X} \pm Sx$ | Ölü/Canlı Spz. Oranı | 34.38±5.96 | 27.80±5.37 | 27.10±5.88 | 30.45±5.87 | 31.83±6.93 | 35.03±3.93 | ** |
| | Motilite | 34.50±7.62 | 47.50±13.59 | 49.00±5.16 | 41.00±8.76 | 40.00±10.54 | 35.00±8.50 | ** |
| 60. saat $\bar{X} \pm Sx$ | | a | b | b | ab | ab | a | |
| | | a | b | b | ab | ab | a | |
| 48. saat $\bar{X} \pm Sx$ | pH | 6.35±0.16 | 6.37±0.15 | 6.31±0.17 | 6.1±0.2 | 6.1±0.7 | 6.0±0.8 | - |
| | Anormal Spz. Oranı | 21.70±3.45 | 18.63±8.93 | 16.60±5.58 | 20.13±5.43 | 21.00±5.84 | 23.40±3.72 | - |
| 48. saat $\bar{X} \pm Sx$ | Ölü/Canlı Spz. Oranı | 31.08±5.83 | 26.58±4.58 | 25.90±5.59 | 28.63±5.71 | 30.40±5.78 | 31.93±5.26 | - |
| | Motilite | 43.00±6.75 | 53.50±11.07 | 54.00±8.43 | 45.50±10.66 | 45.50±9.85 | 47.00±8.23 | * |
| 48. saat $\bar{X} \pm Sx$ | | a | b | b | ab | ab | a | |
| | | a | b | b | ab | ab | a | |
| 36. saat $\bar{X} \pm Sx$ | pH | 6.42±0.17 | 6.46±0.13 | 6.35±0.16 | 6.49±0.14 | 6.37±0.15 | 6.45±0.19 | - |
| | Anormal Spz. Oranı | 17.95±3.50 | 14.95±8.53 | 13.23±5.21 | 15.48±5.09 | 16.90±4.70 | 18.43±4.21 | - |
| 36. saat $\bar{X} \pm Sx$ | Ölü/Canlı Spz. Oranı | 28.20±5.77 | 24.93±4.91 | 14.18±5.72 | 26.73±4.20 | 27.85±5.04 | 29.43±4.98 | - |
| | Motilite | 46.00±6.99 | 57.00±12.74 | 58.50±6.26 | 52.50±7.91 | 51.50±8.18 | 47.00±8.23 | ** |
| 36. saat $\bar{X} \pm Sx$ | | a | b | b | ab | ab | a | |
| | | a | b | b | ab | ab | a | |
| 24. saat $\bar{X} \pm Sx$ | pH | 6.48±0.20 | 6.58±0.21 | 6.37±0.15 | 6.55±0.16 | 6.41±0.12 | 6.50±0.18 | - |
| | Anormal Spz. Oranı | 14.43±3.04 | 11.23±7.08 | 10.63±4.74 | 11.65±3.85 | 12.70±3.01 | 13.45±4.35 | - |
| 24. saat $\bar{X} \pm Sx$ | Ölü/Canlı Spz. Oranı | 26.90±5.36 | 23.45±4.80 | 22.68±5.47 | 25.23±3.87 | 26.00±6.01 | 26.65±5.64 | - |
| | Motilite | 52.50±6.35 | 61.50±10.29 | 62.50±5.40 | 56.00±9.37 | 53.50±7.47 | 54.00±6.99 | * |
| 24. saat $\bar{X} \pm Sx$ | | a | b | b | ab | a | a | |
| | | a | b | b | ab | a | a | |
| 12. saat $\bar{X} \pm Sx$ | pH | 6.50±0.22 | 6.42±0.17 | 6.42±0.17 | 6.48±0.09 | 6.43±0.09 | 6.49±0.20 | - |
| | Anormal Spz. Oranı | 9.35±3.01 | 7.70±5.07 | 7.53±3.58 | 7.93±2.87 | 7.83±2.09 | 9.50±3.45 | - |
| 12. saat $\bar{X} \pm Sx$ | Ölü/Canlı Spz. Oranı | 24.70±4.71 | 21.43±4.04 | 20.38±5.77 | 21.93±3.97 | 23.45±4.34 | 24.63±4.98 | - |
| | Motilite | 57.50±6.35 | 64.50±8.32 | 66.00±6.99 | 63.50±7.84 | 62.00±4.83 | 60.50±6.85 | - |
| 12. saat $\bar{X} \pm Sx$ | | a | b | b | ab | a | a | |
| | | a | b | b | ab | a | a | |
| 0. saat $\bar{X} \pm Sx$ | pH | 6.61±0.20 | 6.73±0.09 | 6.60±0.09 | 6.70±0.14 | 6.60±0.09 | 6.702±0.14 | - |
| | Anormal Spz. Oranı | 4.85±1.92 | 4.50±1.87 | 4.79±2.67 | 5.40±2.73 | 4.73±1.41 | 5.80±2.57 | - |
| 0. saat $\bar{X} \pm Sx$ | Ölü/Canlı Spz. Oranı | 21.93±4.91 | 18.05±3.05 | 17.50±5.14 | 18.65±3.64 | 20.55±3.74 | 21.33±4.34 | - |
| | Motilite | 67.50±5.40 | 72.00±6.75 | 70.00±4.71 | 71.00±6.15 | 70.00±3.33 | 66.00±5.68 | - |
| 0. saat $\bar{X} \pm Sx$ | | a | b | b | ab | a | a | |
| | | a | b | b | ab | a | a | |
| n | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | Önemlilik derecesi (P) |
| Grup | | K | I | II | III | IV | V | |

-: (P>0.05) grup ortalamaları arası fark önemsiz, *: (P<0.05) grup ortalamaları arası fark önemli, **: (P<0.01) grup ortalamaları arası fark önemli, ***: (P<0.001) grup ortalamaları arası fark önemli, ab: aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları fark önemlidir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmada elde edilen verilerden, ergothionin grubunda motilite oranlarının tüm zaman aralıklarında kombine grubu hariç diğer gruplardan daha yüksek, ölü ve anormal spermatozoa oranları ise daha düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, değerlendirilen spermatolojik parametreler açısından kombine grubu ergothionin grubundan daha üstün bulunmasına rağmen, her iki grupta elde edilen sonuçların birbirlerine oldukça yakın oldukları tespit edilmiştir. Araştırmanın ergothionin grubunda elde edilen sonuçları destekler biçimde, Morel³⁶, koç seminal plazmasında bulunmayan ergothioninin seminal plazma içerisindeki diğer biyokimyasal bileşenleri oksidasyona karşı koruduğu için bir antioksidan madde olarak fonksiyon gördüğünü ve seminal plazma bileşenlerinden sistein ve askorbik aside benzer şekilde, spermatozoayı oksidatif ve peroksidatif ajanlardan koruduğunu bildirmiştir.

Bu araştırmada oluşturulan kombine grubunda elde edilen motilite oranları spermatolojik parametrelerin değerlendirildiği tüm zaman aralıklarında (sıfırıncı saatte elde edilen motilite oranı hariç) bütün gruplarda elde edilenlere göre daha yüksek, ölü ve anormal spermatozoa (sıfırıncı saatte elde edilen anormal spermatozoa oranı hariç) oranları ise daha düşük olarak tespit edilmiştir. Araştırmanın kombine grubunda elde edilen sonuçların kimi araştırmacıların bildirdikleri sonuçlar ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür^{12,26}. Her antioksidanın etkili olduğu serbest radikalın farklı olması ve antioksidanların kombine edildiklerinde birbirlerini tamamlayıcı etki göstermeleri, çalışmalarda kullanılan kombine antioksidan sulandırıcılarından daha optimal sonuçlar alınmasının bir nedeni olabileceği düşünülmektedir.

Araştırmanın spermatolojik parametrelerinin değerlendirildiği bütün zaman aralıklarında ortalama motilite oranları SOD içeren grupta kontrol grubuna göre yüksek, ölü ve anormal spermatozoa oranları da kontrol grubuna göre daha düşük olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın SOD grubunda elde edilen sonuçların kimi araştırmacıların bildirdikleri sonuçlarla uyum içerisinde olduğu düşünülmektedir^{12,20-22}.

Bazı araştırmacılar antioksidan maddeleri farklı hayvan türlerinin spermalarına katarak bu spermaları kısa ve uzun süreli olarak saklamışlardır. Aurich ve ark.²⁴ aygır spermasının kısa süreli saklanması için yağsız süt ve glisin sulandırıcılarına antioksidan olarak farklı dozlarda askorbik asit ve katalaz ilave etmişlerdir. Sonuçta askorbik asit ile sulandırılmış grupta anor-

mal spermatozoa oranını kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulduklarını, ancak motiliteye pozitif bir etkinin olmadığını bildirmişlerdir. Bunu destekler nitelikte Ball ve ark.²⁷ da aygır spermasının kısa süreli saklanmasında kullandıkları askorbik asidin spermatozoa motilitesi üzerine pozitif bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise Aurich ve ark.²⁴ ve Ball ve ark.²⁷'nin bildirdiklerinin aksine tüm değerlendirme aşamalarında askorbik asitle sulandırılmış grupta kontrol grubuna oranla daha fazla motilite elde edilmiştir. Çalışmalar arasında oluşan bu farklılığın kullanılan sperma sulandırıcılarının, sperma türünün ve sulandırıcılara katılan antioksidan miktarlarının farklı olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca askorbik asit içeren sulandırıcılarla sulandırılan spermalarda zamana bağlı olarak ortaya çıkan düşük pH'nın motilitede reverzibl bir azalmaya neden olmasıyla askorbik asidin yararlı etkisinin maskelenebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada elde edilen anormal spermatozoa oranlarının ise Aurich ve ark.²⁴'nin elde ettikleri sonuçlarla uyum içerisinde olduğu düşünülmektedir. Bu durum askorbik asidin spermatozoa membranları üzerine koruyucu etkisinin olduğunu ve bunu da membran lipitlerinin peroksidasyonunu önleyerek sağladığını göstermektedir.

Araştırmanın bütün değerlendirme aşamalarında diğer antioksidan içeren sulandırıcı gruplarına göre seminal plazma grubunda en düşük motilite ve en yüksek ölü ve anormal spermatozoa oranları elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar kimi araştırmacıların sonuçları ile uyum içerisindeyken^{27,32}, bazılarıyla uyumsuzluk göstermektedir^{15,33-35}. Çalışmanın seminal plazma grubunda elde edilen sonuçlar ile diğer araştırmalar arasındaki farklılıkların, her memeli türünün seminal plazma içeriğinin, sulandırıcılara katılan seminal plazma oranlarının ve çalışmaların yapıldığı çevre koşullarının farklı olması, bunların yanı sıra seminal plazma ve fraksiyonlarının farklı yöntemlerle elde edilmesi gibi faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, koç spermasının kısa süreli saklanmasında sulandırıcıya katılan antioksidanlardan ergothionin ve araştırmada kullanılan diğer antioksidanlardan oluşturulmuş kombine sperma sulandırıcısının diğer sulandırma gruplarına göre daha başarılı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

- 1 **Cupps PT:** Reproduction in Domestic Animals. Fourth edition. Academic Press, California, 1991.
- 2 **Aitken RJ:** Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*, 7: 659-668, 1995.

- 3 **Castellini C, Dal Bosco A, Bernardini M:** Effect of dietary alfa-tocopherol acetate and ascorbic acid: Vitamin content and oxidation status of rabbit semen. 7th World Rabbit Congress, Italy.105-110, 2001.
- 4 **Hammerstedt RH:** Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: A review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev*, 5: 675-690, 1993.
- 5 **Aitken RJ:** A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev*, 6: 19-24, 1994.
- 6 **Maxwell WMC, Watson PF:** Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 42: 55-65, 1996.
- 7 **Dalvit GC, Cetica PD, Beconi MT:** Effect of alfa-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology*, 49: 619-627, 1998.
- 8 **Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ:** Antioxidant capacity of epididymis. *Human Reprod*, 14: 10pp. 2513-2516, 1999.
- 9 **Armand Z, Garrels K, Phang D:** Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Adult Urology*, 55: 922-926, 2000.
- 10 **Aitken RJ:** The role of free oxygen radicals and sperm function. *Int J Androl*, 12: 95-97, 1989.
- 11 **Maxwell WMC, Stojanov T:** Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev*, 8: 1013-1020, 1996.
- 12 **Watson PF:** The causes of reduced fertility cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 61: 481-492, 2000.
- 13 **Windsor DP, White IG, Selley ML, Swan MA:** Effects of lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal ram sperm function. *J Reprod Fertil*, 99: 359-366, 1993.
- 14 **Viswanath R, Shannon P:** Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev*, 9: 312-331, 1997.
- 15 **Lopez A, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H:** Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. *Acta Vet Scand*, 40: 1-9, 1999.
- 16 **Beconi MT, Affranchino MA, Schng LM, Beorlegui NB:** Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. *Biochem Int*, 23(3): 545-553, 1991.
- 17 **Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM:** Glutathione and hypotaurine in vitro: Motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*, 15(1): 61-68, 2000.
- 18 **Lopez-Saez A, Ortiz N, Gallego L, Garde JJ:** Liquid storage (5 °C) of ram semen in different diluents. *Arch Androl*, 44: 155-164, 2000.
- 19 **Alvarez JG, Storey BT:** Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from oxygen toxicity due to lipid peroxidation. *Biol Reprod*, 28: 1129-1130, 1983.
- 20 **Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT:** Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl*, 8: 338-348, 1987.
- 21 **Kobayashi T, Miyasaki T, Natori M, Nozawa S:** Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: Superoxide dismutase activity and lipid peroxidase in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod*, 6: 987-981, 1991.
- 22 **Maxwell WMC, Salamon S:** Liquid storage of ram semen: A Review. *Reprod Fertil Dev*, 5: 613-38, 1993.
- 23 **Aurich JE, Schonherr U, Hoppe H, Aurich C:** Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, 48: 185-192, 1997.
- 24 **Donoghue AM, Donoghue DJ:** Effects of water and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult Sci*, 76: 1440-1445, 1997.
- 25 **Upreti GC, Jensen K, Oliver DM, Duganzich R, Munday R, Smith JF:** Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*, 48: 269-278, 1997.
- 26 **Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J:** Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, 56: 577-589, 2001.
- 27 **Ashworth PJC, Harrison RAP, Miller NG, Plummer JM, Watson PJ:** Survival of ram spermatozoa at high dilution: Protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Develop*, 6: 173-180, 1994.
- 28 **Maxwell WMC, Welch GR, Johson LA:** Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, 8: 1165-1178, 1997.
- 29 **Barrior B, Perez-Pe R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T:** Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod*, 63: 1531-1537, 2000.
- 30 **Perez-Pe R, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T:** Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, 56: 425-434, 2001a.
- 31 **Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA:** Sperm washing method alters the ability of seminal plasma proteins to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Int J Androl*, 24: 352-359, 2001b.
- 32 **De Lamirande E, Gagnon C:** Origin of a motility inhibitor within the male reproductive tract. *J Androl*, 5: 269-276, 1984.
- 33 **Iwamoto T, Gagnon C:** A human seminal plasma protein blocks the motility of human spermatozoa. *J Urol*, 140: 1045-1048, 1988.
- 34 **Al-Somai N, Viswanath R, Molan PC:** Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm. *Reprod Fertil Dev*, 6: 165-171, 1994.
- 35 **Morel MCGD:** Production of spermatozoa. Equine Artificial Insemination, CABI Publishing. 78-150, 1999.

Yazışma adresi (Correspondence address)

Dr. Savaş YILDIZ
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama A.B.D
36100 Paşaçayırı / Kars – TÜRKİYE
Tel: +90 474 2426800/1251
Fax: +90 474 2426853
e-mail: savasyildiz75@hotmail.com