



**T.C.**

**SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANGAL AKKARAMAN KOÇU SPERMALARININ  
SEMİNAL PLAZMASINA FARKLI ISI  
UYGULAMALARININ KISA SÜRELİ SAKLANMASINDA  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**SALİH NARLIÇAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI**

**SİVAS-2019**

**T.C.**  
**SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANGAL AKKARAMAN KOÇU SPERMALARININ**  
**SEMİNAL PLAZMASINA FARKLI ISI**  
**UYGULAMALARININ KISA SÜRELİ SAKLANMASINDA**  
**ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**



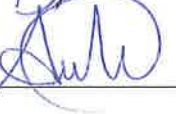


**SALİH NARLIÇAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. BARIŞ ATALAY USLU**

**SİVAS-2019**

**“Kangal Akkaraman Koçu Spermalarının Seminal Plazmasına Farklı Isı Uygulamalarının Kısa Süreli Saklanması Etkilerinin Araştırılması”** adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Suni Tohumlama** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Doç.Dr. Barış Atalay USLU	
Üye	Doç.Dr. Bahat COMBA	
Üye	Dr. Öğr.Üyesi Alper KOÇYİĞİT	
Üye		
Üye (Danışman)	Doç.Dr. Barış Atalay USLU	

ONAY

Bu tez çalışması, ..... Tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda Akın POLAT  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

## TEŞEKKÜR

Yapılan tez çalışması ve tüm Yüksek Lisans eğitimim süresince beni her daim destekleyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Barış Atalay USLU'ya bu günlere gelmemden dolayı sonsuz teşekkür ederim. Yüksek Lisans öğrenim sürecinde bilgi ve tecrübeleriyle gelişimimde büyük katkısı bulunan Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Alper KOÇYIĞIT'e teşekkür ederim. Sunulan tez çalışmasının uygulamalarında bana yardım eden ve benim için çok değerli bir yere sahip olan Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Rahmetli Seyrani Mersin'e teşekkür ederim. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Murat YÜKSEL'e teşekkür ederim. Ayrıca Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Hastanesi öğretim üyelerine ve idari personeline yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Yürüdüğüm bu yolda her türlü desteği ile yanımda olan, sabrı, anlayışı ve bana kattığı tüm güzellikler için hayat arkadaşım Esra NARLIÇAY'a minnettarım. Beni bugünlere getiren her türlü maddi manevi yardımı ile desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve benim biricik bitanecik kızım Aybala'ya her daim yanımda oldukları için çok teşekkür ederim

## ÖZET

### KANGAL AKKARAMAN KOÇU SPERMALARININ SEMİNAL PLAZMASINA FARKLI ISI UYGULAMALARININ KISA SÜRELİ SAKLANMASINDA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Salih NARLIÇAY

Yüksek Lisans Tezi

Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Barış Atalay USLU

2019, XX sayfa

Bu tez çalışmasında, spermada bulunan seminal plazmanın spermeler üzerindeki etkisini gözlemlemek ve reproduktif amaçlı kullanımını değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Araştırma için, 24-36 aylık yaşlarda, 8 baş ergin koçtan alınan spermalar kullanılmıştır. Spermalar çiftleşme mevsimi dışında elektro ejakülatör yardımı ile alınmıştır. Alınan spermalar birleştirildikten sonra 3 eşit hacme bölünmüştür. 28 °C'lik su banyosunda işlemlerden geçirilmek üzere bırakılmıştır. Spermalar seminal plazmalarından santrifüjle ayrılıp, 60 °C'lik ve 80 °C'lik 10 dakikalık ısıtma işleminden geçirilip tekrar 28 °C'lik ortamda ayrıldıkları spermeler ile birleştirilmiştir. Birleştirilen 60 °C'lik ve 80 °C'lik gruplar ile hiçbir işlem uygulanmayan kontrol gurubu +4 °C'lik ortamda bekletilmeye alınmıştır. Ortalama 8 saatte bir kontrol edilen 3 grupta gözlenen motilite, canlı/ölü oranı ve sperm anormallikleri kaydedilmiştir. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubu ve deneme grupları karşılaştırıldığında en uzun süre motilitenin devam eden grup, 80 °C'lik grup olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre spermanın seminal plazmasının içerisinde bulunan çeşitli proteinlerin ve enzimlerin denatürasyonu ile yaşam süresinin, normal sperm oranının ve motilitenin doğru orantılı bir şekilde arttığını kanıtlar niteliktedir. Bundan sonraki koç spermasının dondurulması ile ilgili çalışmalarda eklenti bezi sıvılarının 80 °C'de 10 dakika bekletilerek tekrar spermaya eklenmesi ile spermanın dondurulmasında daha iyi sonuçlar alınabileceği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Koç, Elektro ejakülatör, Sperma, Seminal Plazma, Motilite.

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DIFFIRENT SEMINAL PLASM HEATING PROCESSES ON SHORT TERM STORAGE OF THE AKKARAMAN KANGAL RAM SPERM

Salih NARLIÇAY

Master Thesis

Departments of Reproduction and Artificial Insemination

Advisor: Doç. Dr. Barış Atalay USLU

2019, XX page

In this research, seminal plasma in sperm was examined to determine the effect on sperm and to evaluate the use of reproductive purposes. For the research, the sperm obtained from 24-36 months of age 8 rams was used. Sperm was collected with the help of electro- ejaculator out off mating season. The sperm collected were divided into 3 equal volumes after combining. It was kept to process in a 28 °C water bath. The sperm were separated from the seminal plasma by centrifugation and combined with the sperm that is separated from after it was kept in 60 °C and 80 °C for 10 minutes and separated again in 28 °C medium. The untreated control group and 60 °C and 80 °C groups were kept in a 4 °C environment. Motility, live / dead ratio and sperm abnormalities were recorded in 3 groups that were controlled once every 8 hours. According to the results of the study, when the control group and experimental groups were compared, the group with the longest duration of motility was determined as 80 °C group. Result of the this study prove that, the denaturation of various proteins and enzymes in seminal plasma of sperm directly proportional to life time, abnormalities and motility. It is concluded that better results could be yielded in process of sperm freezing by keeping additive gland fluids in 80 °C for at least 10 minutes.

**Key words:** Ram, Electro-ejaculator, Sperma, Seminal Plasma, Motility.

# İÇİNDEKİLER

<b>YÖNERGE</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>TABLolar VE ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>KISALTMALAR SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>2</b>
2.1. Koç Spermasının Alınması .....	4
2.2. Koç Spermasının Genel Özellikleri .....	4
2.2.1. Koçlarda spermatolojik özellikler .....	5
2.3. Koç Spermasının Saklanması .....	5
2.3.1. Koç spermasının uzun süreli saklanması .....	5
2.3.2. Koç spermasının kısa süreli saklanması .....	7
2.4. Koç Spermasına Katılan Antioksidanlar .....	7
2.5. Spermanın Dondurulmasında Kullanılan Kryoprotektif Maddeler .....	8
2.5.1. İnternal kryoprotektanlar .....	8
2.5.2. Eksternal kryoprotektanlar .....	9
2.6. Ek Cinsiyet Salgı Bezleri .....	10
2.6.1. Vesicular bezler .....	10
2.6.2. Prostat bezi .....	10
2.6.3. Bulbouretral Bezler (Cowper Bezleri) .....	11
2.7. Seminal Plazma .....	11
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>13</b>
3.1. Materyal .....	13



3.2. Spermanın Alınması.....	13
3.3. Spermanın Muayenesi.....	14
3.4. Makroskobik Muayene .....	14
3.4.1. Spermanın rengi .....	14
3.4.2. Sperma miktarı .....	14
3.4.3. Spermanın pH değeri.....	14
3.5. Mikroskobik Muayene .....	15
3.5.1. Sperm motilitesi .....	15
3.5.2. Spermanın yoğunluğu.....	15
3.5.3. Anormal sperm oranı.....	15
3.5.4. Ölü-canlı sperm oranı.....	15
3.6. Grupların Belirlenmesi ve Muayeneler.....	16
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>17</b>
4.1. Koçların Spermatolojik Parametreleri .....	17
4.2. Spermanın Gruplara Ayrılması ve Muayene Süreci .....	17
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>23</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>27</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>39</b>

## TABLolar VE ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> TarihlerE göre Türkiye'deki koyun varlığı (TUİK). .....	2
<b>Tablo 2:</b> Çalışma başında tüm koçlardan alınan spermaların spermatolojik parametreleri. ....	17
<b>Tablo 3:</b> Kontrol grubunda Motilite ve Canlı / Ölü Sperm oranı. ....	18
<b>Tablo 4:</b> Kontrol grubunda saatlere göre normal ve anormal sperm oranları. ....	19
<b>Tablo 5:</b> Grup 2'de Motilite ve Canlı / Ölü Sperm oranı. ....	20
<b>Tablo 6:</b> Grup 2'de saatlere göre normal ve anormal sperm oranları. ....	20
<b>Tablo 7:</b> Grup 3'de Motilite ve Canlı / Ölü Sperm oranı. ....	21
<b>Tablo 8:</b> Grup 3'de saatlere göre normal ve anormal sperm oranları. ....	22
<b>Çizelge 1:</b> Kontrol grubu spermatolojik değerlerin zamana göre değişimi. ....	19
<b>Çizelge 2:</b> Grup 2'de spermatolojik değerlerin zamana göre değişimi. ....	21
<b>Çizelge 3:</b> Grup 3'de spermatolojik değerlerin zamana göre değişimi. ....	22

## KISALTMALAR SİMGELER DİZİNİ

<b>C°</b>	Santigrat
<b>SV</b>	Suni Vajen
<b>EE</b>	Elektro ejakülatör
<b>ml</b>	Mililitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>mg</b>	miligram
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>EG</b>	Etilen Glikol
<b>C</b>	Karbon
<b>OH</b>	Hidroksit
<b>DMA</b>	Dimetilasetamid
<b>Lp</b>	Lipoprotein
<b>BSA</b>	Sığır serum albümini
<b>Na</b>	Sodyum
<b>Cl</b>	Klor
<b>Ca</b>	Kalsiyum
<b>Mg</b>	Magnezyum
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>CRISP</b>	Cystein Rich Secretory Proteins
<b>GPC</b>	Gliserilfosforilkolin

## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artmasıyla birlikte insanların gıda ürünlerini temin etmesi zor bir hale gelmiştir. Temel besin maddelerinden hayvansal proteine çok daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Kırmızı et üretilmesi için oldukça rasyonel olan, en verimsiz meraları bile ağız ve dudak yapısı sayesinde iyi değerlendiren koyunların sayısının ve verim özelliklerinin artırılması gerekmektedir. Koyunculukta halk tarafından yıllardır üreticiliği yapılan düşük verimli yerli ırkların ıslahı için gerekli olan koç spermasının dondurularak saklanabilmesi bu açıdan büyük bir önem arz etmektedir. Hayvancılık alanında vazgeçilmez öneme sahip olan üreme biyoteknolojisi; suni tohumlama, in-vitro fertilizasyon, gen transferi ve klonlama gibi birtakım yenilikleri kapsamaktadır. Bu teknikler arasında en eski ve pratik kullanım alanı olan suni tohumlamadır. Suni tohumlama, hayvan türlerinde genetik ilerlemenin sağlanabilmesi amacıyla kullanılan en yaygın yöntemdir. İyi bir damızlık erkek hayvandan elde edilen sperma ile bir yılda on binlerce dişi tohumlanabilmektedir.

Suni tohumlamanın başarılı olabilmesi için spermanın uzun süre saklanması, koç spermasının dondurularak saklanması ve spermanın çözülmesi sonucunda suni tohumlama uygulamalarında başarılı olunabilmesi için birçok bilimsel çalışma yapılmıştır. Konu güncelliğini korumakta ve yeni çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir.

Eklenti bezleri, spermanın saklanmasında bazı sıvıların salgılanması ile enerji kaynağı ve pH dengesini sağlayan organik maddeler salgılamaktadır. Bu sayede spermlerin motilitesini ve fertilesini artırmada önem ihtiva eder.

Bu tez çalışmasında, koç spermasının saklanmasında eklenti bezi sıvıları içerisindeki enzimlerin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla; seminal plazma spermadan ayrılmış ve 60-80 °C'de 10 dk bekletilmiş, tekrar spermaya eklenmiş ve yaşama süreleri incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Türkiye hayvancılığı içerisinde koyun yetiştiriciliğinin önemli bir yeri vardır. Koyun beslenmesindeki doğal kaynakların varlığı ve meraların uygunluğu, halkın sosyo-ekonomik yapısı ve tüketim alışkanlıkları gibi nedenler bu önemi arttırmaktadır (Avdatek, 2013).

Tablo 1: Tarihlerle göre Türkiye'deki koyun varlığı (TUİK).

YIL	KOYUN SAYISI (BAŞ)
1995	33.791.000
1999	30.256.000
2003	25.431.539
2007	25.462.293
2010	23.089.691
2013	29.284.247
2016	30.983.933
2017	33.677.676
2018	35.195.000

Bilinçli yetiştiricilikte en önemli hedef sürdürülebilir bir düzen oluşturulmasıdır. Çiftlik hayvanlarının en önemli verimi döl verimidir. Döl verimi düzenli ve devamlı olduğunda yetiştiriciye temel olarak iki yönde fayda sağlar. Bunlardan birincisi, döl verimi yüksek sürülerde daha sıkı seleksiyon yapma imkânının olması, ikincisi ise elde edilen yavrulardan damızlık dışı kalanların sayısal artışıyla sağlanacak kazancın yükselmesidir (Avdatek, 2013).

Koyunlar sürü hayvanları olduğu için bireysel infertilite veya sterilite olguları erkek hayvanlarda dişi hayvanlardan daha büyük önem taşımaktadır. Koyunlar mevsimsel poliöstrik hayvanlar olduklarından aşım sezonunda gebe kalmayan dişiler genellikle kesime sevk edilir. Sürüden çıkarılan dişiler elde edilecek yavru sayısında bir

azalmaya neden olurlar. Damızlık olarak seçilecek erkek hayvanların infertil olması ise tüm sürünün populasyon büyüklüğünü etkiler. Androlojik muayene, yüksek verimli ırkların oluşturulmasında ve geliştirilen genotiplerin devamlılığının sağlanmasında önemli bir yer tutar (Avdatek, 2013).

Spermanın saklanması temel yaklaşım spermelerin metabolizmasını yavaşlatmak ve hareket enerjilerini azaltarak yaşam sürelerini uzatmaktır. Yapılan araştırmalar sonucunda spermanın saklanması için iki yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan birincisi kısa süreli saklama, ikincisi ise 0 °C'den daha düşük ısılarda dondurularak uzun süreli saklamadır (Uçan, 2014).

Günümüzde boğa spermasının dondurularak suni tohumlama amacıyla kullanılması sonucunda elde edilen başarı oldukça yüksek seviyelerdedir. Koç ve teke spermalarının dondurularak suni tohumlama uygulamalarında kullanılması boğalar kadar başarılı düzeylere ulaşamamıştır. Bunun en önemli nedenlerinden birisi koç ve teke spermalarının plazma membran yapısının donmaya karşı oldukça hassas olmasıdır.. Koç spermalarının membran yapısının yüksek oranda doymamış yağ asiti içermesi dondurma-çözdürme süreci içerisinde yüksek oranda ölmesi, düşük ısıya daha duyarlı olması, tüm bu başarısızlıkların sebebi olarak öne sürülmüştür (Uçan, 2014).

Sperm kendilerini çevreleyen ortamla madde alışverişlerinin sağlanmasında plazma membranına ihtiyaç duyarlar. Ayrıca kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon olaylarında spermelerin oosit yüzeyine tutunabilmesi için de plazma membranı hasarı oluşmamış normal bir sperme ihtiyaç vardır (Töpfer-Petersen ve ark., 1990). Spermanın dondurulması sırasında şekillenen membran hasarları başlıca 3 nedene bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bunlar; intra-cellular ve extra-cellular buz kristali oluşumu (Mazur, 1977; Watson, 1995), ozmotik değişikliklere bağlı zararlar (Mazur, 1984; Steponkus ve ark., 1983) ve soğuk şokuna (Watson, 2000) bağlı zararlarıdır. Spermanın dondurulması sırasında çevre ısısının düşmesine bağlı olarak spermelerin plazma membranlarında yer alan lipidler fiziksel değişikliklere uğrayarak yumuşak ve akışkan durumlarını yitirir, daha sert ve daha az akışkan bir hale gelirler. İşte bu durum değişikliği (faz geçişi) soğuğa maruz kalan sperm plazma membranlarının akışkanlığının azalmasının temel nedenidir (Nolan ve Hammerstedt

1997). Soğutma ya da dondurma sırasında sperm plazma membranında ortaya çıkan hasarların bu durum değişikliği sonrasında lipidlerin yeniden başlangıçtaki biçimde organize olamaması veya normal dağılımlarını kazanamamaları neticesi olduğu ifade edilmektedir (Buhr ve ark., 1994; Holt ve North, 1986). Bu nedenle, sperm plazma membranında bu durum değişikliği olgusunun azaltılması veya tamamen ortadan kaldırılması soğuğa bağlı ortaya çıkacak hasarların da azaltılmasına olanak sağlayabilir (Uçan, 2014).

## **2.1. Koç Spermasının Alınması**

Sun'i tohumlama uygulamaları için ve çeşitli biyoteknolojik çalışmalar yapabilmek için öncelikle erkek damızlıklardan spermanın alınması gerekir. Koçlardan spermanın alınabilmesi için Sun'i vajen (SV) (Moore, 1983; Cupps, 1991) ve Elektro-Ejekulatör (EE) (Moore, 1983; Cupps, 1991; Cameron, 1977) yöntemleri tercih edilmektedir. SV yöntemi; basit, hızlı ve iyi kalitede sperma elde etme açısından daha çok tercih edilmektedir. Fakat sperma alınırken östrus döneminde koyuna ihtiyaç duyulması nedeniyle, çoğunlukla aşım sezonu sınırlı kalmaktadır. Ayrıca, koçun sağlıklı ve sun'i vagene sperma vermeye alışık olması gereklidir. Bu şartların mevcut olmadığı durumlarda, sperma almak için EE yöntemiyle sperma alma kaçınılmaz olmaktadır. Ancak, hayvan açısından rahatsız edici olması ve daha fazla işgücüne ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Trimberger, 1974; Evans ve Maxwell, 1987; Yurdaydın, 1990; Cupps, 1991).

## **2.2. Koç Spermasının Genel Özellikleri**

Diğer çiftlik hayvanları ile kıyaslandığında ırk, yaş, beslenme, sperma alma yöntemi, sperma alma sıklığı, sperma alma zamanı ve mevsim gibi faktörlere bağlı olmakla birlikte koç ve tekelerde ejakulat miktarı çok düşüktür. Koç ejakulat hacmi ortalama 1 ml'dir. Sağlıklı bir koç ejakulatın rengi gri-beyazdan krem rengine kadar değişim gösterebilir. Koç sperması koyu kıvamlıdır ve kıvamı ile yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Koç spermasının motilitesi ortalama % 70, pH sı 6.2-6.9 arasında değişmekte olup  $3 \times 10^9$  /ml yoğunluğunda ve ortalama % 20 anormal sperm oranına sahip olduğu belirtilmektedir (Evans ve Maxwell, 1987)

### 2.2.1. Koçlarda spermatolojik özellikler

Curry ve ark. (1994), koç sperm uzunluğunu 60µm, hacmini 31 µm<sup>3</sup>, yüz ölçümünü 142µm<sup>2</sup>, olarak ölçmüşler, sperm baş, boyun, orta kısım, kuyruk ve kuyruk ucu uzunluğunun sırasıyla 8,3 µm, 1 µm, 8-10 µm, 40-50 µm, 3 µm olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar sperm baş kısmının 4 µm, genişliğinde ve 1 µm kalınlığında olduğunu bildirmişlerdir. Bir spermin kuru ağırlığının 2,0-2,5x10<sup>-8</sup> mg, yağ ağırlığının ise 11-13x10<sup>-8</sup> mg olduğunu bildirmişlerdir (Ak, 2000). Bu ağırlık dağılımının % 50'si başta, % 15'i orta kısım ve % 35'i kuyruk kısmında olacak şekildedir. İleri (1985), Tahirova ırkı koçlardan SV yardımıyla aldığı spermada, ortalama 0,8-1,2 ml hacim, 2-4 mass aktivite, 2.4-2.8 x10<sup>9</sup> /ml spermatozoon yoğunluğu, % 85-94 canlı sperm ve % 8-15 morfolojik bozukluk saptamıştır. Ak (2000), koçlarda ortalama sperma hacminin 1 ml, sperma yoğunluğunun 2-3 x10<sup>9</sup> /ml, motilitenin % 80-90, mass aktivitenin (++++), anormal sperm oranının % 5-15 arasında olduğunu bildirmiştir.

### 2.3. Koç Spermasının Saklanması

Spermanın saklanmasında temel yaklaşım spermelerin metabolizmasını yavaşlatmak ve enerji kullanımlarını minimize ederek fertil ömürlerini uzatmaktır. Günümüzde diğer hayvan türlerinde olduğu gibi koçlarda da sperma temel olarak 2 yöntemle saklanır. Bunlardan birincisi uzun süreli saklamadır. Dondurarak saklamada denilen bu yöntemde, spermanın 0°C'den daha düşük ısılarda dondurulması ile saklanmasına gidilir. İkinci yöntem ise kısa süreli saklamadır. Bu yöntemde spermanın ısısı +4 °C'ye düşürülerek ve metabolizmasını yavaşlatarak sıvı şekilde saklanmasıdır (Bailey ve ark., 2003).

#### 2.3.1. Koç spermasının uzun süreli saklanması

Bilimsel ve modern anlamda hücre dondurma çalışmaları, 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının gliserolün kriyoprotektan (soğuk şokuna karşı koruma sağlayıcı) özelliğini bulmasından sonra başlamış, ilk dondurulan hücre sperm olmuştur. Bu anlamda kriyobiyoloji, hücre, doku, organ ve organizmaların dondurulmasını inceleyen



bilim dalı olarak önemini artırmış ve dondurulan-çözdürülen hücrenin fizyolojik-fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır (Leibo ve Brandley, 1999, Polge ve ark., 1949).

Koç spermasının dondurmaya karşı duyarlı olmasının temel nedeni sperm membranının önemli bir kısmını doymamış yağ asitlerinin (fosfolipitler) oluşturmasıdır. Buna bağlı olarak spermelerin dondurulması sırasında yapılan soğutma işlemleri sperm membranının geriye dönüşümü olmayan sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmakta ve membran içi enzimlerin kinetiğinde değişimlere yol açarak çözüm sonu canlılığın azalmasına sebebiyet verdiği öne sürülmektedir (Watson, 1995).

### ***Spermanın payet yöntemi ile dondurulması***

Sulandırılmış spermanın, 0,25 ya da 0,50 ml kapasitede payet denilen ince plastik tüplerde, sıvı azot buharında dondurulması yöntemidir. Daha sonra bu payetler, sıvı azota (-196 °C) daldırılır ve saklanır. 5 °C'de çalışan kabinde bulunan özel payet doldurma makinesi yardımı ile payetlerin içine ekilibrasyonu tamamlanmış sulandırılmış sperma doldurulur (Ak, 1994b; Arthur ve ark., 1996). Sperma ile dolu payetler 5 °C'lik ortamda taraklara dizilirler. Payetler içindeki sperma sıvı azot seviyesinin 4 cm yukarısında yaklaşık on dakika sürede dondurulur. Sıvı azot buharındaki yaklaşık -120 °C ile -140 °C'de dondurulan payetler aynı ortamda gobletlere yerleştirilir ve sıvı azot içinde -196 °C'de depolanır (Sevinç, 1984; Ak, 1994b; Arthur ve ark., 1996; Sönmez, 2008).

Günümüzde payet yöntemiyle dondurmada geleneksel metot yanında sıvı azotla çalışan dondurma makineleri de kullanılmaktadır. Mikroişlemci-kontrollü bu dondurucuların kullanımı yoluyla dondurma işlemi üzerindeki kontrol imkânı artmıştır. Daha maliyetli olan bu işlemde spermaların canlı kalma oranı da daha fazladır (Arthur ve ark., 1996).

### **2.3.2. Koç spermasının kısa süreli saklanması**

Koç spermasının 5 °C'ye soğutulma süresi genellikle 1-3 saat arasında değişir (Salamon ve Maxwell, 1995b). Spermanın 30 °C'den 15 °C'ye hızla soğutulmasının spermlerin canlılığı üzerine çok önemli olumsuz bir etkisi olmayabilir, fakat 10 °C, 5 °C, 0 °C gibi daha düşük ısılarla hızla soğutulduğunda eritme sonrası motilitelerde azalmalar görülmüştür (Fiser ve Fairfull, 1986). Gliserolsüz sulandırıcılarda spermanın 2 saatten daha kısa sürede soğutulmasının zararlı olduğu ve ısının kademeli olarak düşürülmesi gerektiği belirtilmiştir (Evans ve Maxwell, 1987; Salamon ve Maxwell, 1995b). Ak ve ark., (1998) Kıvrıcık ırkı koç spermasını 30 °C'de 1 / 0,5 ve 1 / 1 oranında sulandırarak, yavaş (0.2 °C /dakika) ve hızlı (2 °C /dakika) soğutmuşlar, eritme sonrası düşük ve yüksek sulandırma oranlarında sırasıyla; yavaş soğutmada % 16,7±7,23; % 53,3±6,46 motilite, % 40,6±5,13; % 25,6±5,94 akrozomal bozukluk, hızlı soğutmada, % 24,1±8,46; % 53,3±6,46 motilite, % 38,0±5,13; % 36,8±9,52 akrozomal bozukluk bulmuşlardır. Spermanın 18 °C'den 5 °C'ye soğutulmasında, hızlı soğutmadan kaçınılması gerektiği, çünkü bu ısı aralığında spermlerin özellikle soğuk şokuna karşı hassas oldukları ifade edilmiştir (Fiser ve Fairfull, 1986; Maxwell ve Watson, 1996; Salamon ve Maxwell, 1995b; Watson, 2000). Ancak Fiser ve Fairfull (1986), koç sperması için 15 °C ve altı ısılar çok daha kritik olmasına rağmen, soğuk şokunun oda sıcaklığında bile başlayabileceği rapor edilmiştir. Rete testis veya kaput epididimisteki koç sperm hücrelerinin ejaküle edilmiş spermaya göre soğuk şokuna karşı daha dayanıklıdır (White, 1993; Windsor ve ark., 1988).

### **2.4. Koç Spermasına Katılan Antioksidanlar**

Sperma fonksiyonlarının aksaması ve infertilite üzerine birçok çevresel, fizyolojik ve genetik faktör etkilidir. Bu faktörlerden spermler üzerine etkili olan serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasar önem kazanmaktadır (Sikka, 1996). Son yıllarda dondurulma ve çözündürülme esnasında spermlerde ortaya çıkan hasarlar mikro düzeyde ortaya konabilmiş, dondurulma sırasında oluşan oksidatif stresin önemli hasarlara yol açtığı bildirilmiştir (Potts ve ark., 2000).

Koç spermasına katılan belli başlı antioksidanlar; vitamin E (Tümen ve ark., 1991), taurin (Sanchez-Partida ve ark., 1997), sistein, hyaluronik asit (Uysal ve Bucak, 2007), trehaloz (Bucak ve ark., 2007), glutatyon peroksidaz (Pomares ve ark., 1994) olarak sıralanabilir.

## **2.5. Spermanın Dondurulmasında Kullanılan Kryoprotektif Maddeler**

Biyolojik dokuları ve hücreleri dondurmanın zararlı etkilerinden koruyan maddeler kryoprotektan olarak adlandırılır. Spermanın dondurulmasında kullanılan sulandırıcıda kryoprotektif özellikli maddelerin bulunması gereklidir. Kryoprotektanlar hücrenin soğutulması ve dondurulması esnasında gelişen fiziksel, kimyasal ve oksidatif stres hasarlarını azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Kryoprotektan maddeler temel olarak hücre içerisine girebilen (permabl -internal) ve hücre içerisine giremeyen (eksternal) kryoprotektanlar diye iki gruba ayrılırlar (Bucak ve Tekin, 2008).

### **2.5.1. İnternal kryoprotektanlar**

Permeabl özelliğe sahip kryoprotektan olarak gliserol, etilen glikol (EG), formamide, dimetilsülfoksit (DMSO) bu gruba örnek olarak sayılabilir. Bu tür kriyoprotektanlar etkilerini, hücre zarından içeriye girerek ve “kolligatif” olarak göstermektedir. Koruyucu etkileri donma esnasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (Leibo ve Brandley 1999; Holt, 2000; Leeuw ve ark., 1993; Mcgann 1978).

Dondurma işleminde kullanılan bazı internal kryoprotektanlar aşağıda belirtilmiştir;

*Gliserol*

*Etilen glikol (EG)*

*Amid türevi kryoprotektanlar*

*Dimetilsülfoksit (DMSO)*

### **2.5.2. Eksternal kriyoprotektanlar**

Eksternal kriyoprotektanlar (hücreye penetrasyon özelliğine sahip olmayanlar) ekstraselüler etkilerinden dolayı hücre membranındaki esnekliğin kaybını önledikleri, membran proteinlerinde stabilizasyon sağladıkları ve ekstraselüler ortamda gelişen kristalizasyonu azalttıkları bilinmektedir (McWilliams ve ark., 1995; Cabria ve ark., 2001).

Eksternal kriyoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır.

#### ***Makromoleküller***

Makromoleküler yapıdaki maddeler (özellikle lipoproteinler) membran bütünlükleri ve içerdiği antioksidanlar sayesinde de oksidatif strese karşı koruyucu etkiye sahiptir. Makromoleküllerinden en çok kullanılanları polietilen glikol, ficoll 70, sığır serum albümini (BSA), dekstran, mannitol ve polivinilprolidon'dür. BSA'nın lipid peroksidasyon inhibitörü olduğu düşünülmektedir (Cabria ve ark., 2001; Kasai, 1996; McGann, 1978).

#### ***Sakkaritler***

Monosakkaritler olarak, glukoz ve galaktoz; disakkarit olarak, sükroz, trehaloz; trisakkarit olarak da rafinoz, melezitoz sayılabilir. Sakkaritler, ölümcül etkili hücre içi kristal oluşumunu engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar. Şekerler donma ve çözüm esnasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı oluşturarak koruma sağlamakta ve çözüm işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir (McWilliams ve ark., 1995, McGann 1978).

## **2.6. Ek Cinsiyet Salgı Bezleri**

Ek cinsiyet salgı bezleri, kanalları vasıtasıyla uretranın içerisine salgılarını boşaltırlar. Ek cinsiyet salgı bezleri vesicular bezler, prostat bezi ve bulbouretral bezler olmak üzere üç tanedir. Bu bezler salgıladıkları sıvılarla spermanın hacmini artırmakta olup, bunun yanı sıra bir buffer solüsyonu olduğu için spermanın normal motilitesini ve fertilitatesini sağlamak için ihtiyaç duyulan besin maddelerini diğer maddeleri içermektedir (Demirci, 2007).

### **2.6.1.Vesicular bezler**

Vesicular bezlere vesicula seminalis de denir. Bir çift ve lobuler yapıda olan yumrulu görünüşlerinden dolayı kolayca teşhis edilebilen bezlerdir. Üzüm salkımı şeklinde bir görünüşe sahiptirler. Koç ve tekenin vesicular bezleri boğa ve aygırlara nazaran daha küçük yapıda olup yaklaşık 4 cm uzunluğundadır. Vesicular bezlerin boşaltıcı kanalları ampullalar ile uretranın birleştiği çatallaşma yerinin yakınından uretraya açılır. Bu bezler sıvı hacmine önemli derece katkı sağlar. Vesicular bezlerin salgılarında bulunan bazı organik bileşikler sadece bu salgıların içerisinde bulunmakta olup vücudun başka yerinde böyle önemli miktarda bulunmazlar. Bu bileşiklerin ikisi fructose ve sorbitol koç spermatozoonları için çok önemli olan enerji kaynağı ihtiva ederler. Vesicula seminalisin salgılarında bulunan hem fosfat buffer hem de karbonat buffer spermanın pH değişimlerine karşı spermin koruması bakımından çok önemlidir (Demirci, 2007).

### **2.6.2.Prostat bezi**

Prostat, vesicular bezlerin boşaltıcı kanallarının hemen posterior kısmında uretra boyunca ve onun çevresinde yerleşmiş tek bir bezdir. Koçlarda prostatın tümü uretral kasların içerisine gömülüdür. Prostat bezi koçta uretranın dorsalinde yer alır. Prostat bezinin spermaya az bir katkısı bulunur. Yapışkan ve kendine has bir kokusu bulunan prostat salgısı, Na, Cl, Ca ve Mg inorganik iyonları yönünden oldukça zengindir. Bu salgılar spermlerin motilite ve fertilitate yeteneğini artırır (Demirci, 2007).

### 2.6.3. Bulbouretral Bezler (Cowper Bezleri)

Bulbouretral bezler erkeğe ait uretranın pelvisden çıkış noktasına yakın arcus ichiadicus yakınlarında ve uretra boyunca yerleşmiş bir çift bezdir. Yaklaşık 2-3 cm kadardır. Cowper bezlerinin salgıları spermanın sıvı kısmına çok az katkıda bulunur. Müköz etkisinden dolayı spermanın kıvamının oluşmasında bu salgılar etkilidir. Ejekülasyondan önce idrar kalıntılarını temizliyerek uretrayı spermler için uygun hale getirir. Çiftleşmeden hemen önce bu salgıların preputiumdan damla damla aktığı görülmektedir (Demirci, 2007; Sönmez, 2013).

### 2.7. Seminal Plazma

Seminal plazma, genital kanaldaki bazı çeşitli bezlerin salgılarından oluştuğu bilinmektedir. Seminal plazmanın içerdiği bu maddeler gösterdikleri fonksiyonlarla hangi bezlerden üretildiğini belgeler niteliktedir. Seminal plazma proteinleri, erkek genital organlarından epididimis, testisin seminiferöz tubülleri ve leydig hücrelerinden, vesikula seminalis ve prostat bezinden sentezlenmekte ve salınmaktadır (Duru, 2001).

Seminal plazmanın içeriği, amino asitler, peptidler, inorganik bileşikler, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerden oluşur. Bu maddeler türler arasında farklılıklardan dolayı değişimler göstermektedir. Ayrıca seminal plazmadaki doğal antioksidanlar ve diğer faydalı komponentler spermatozoanın fonksiyonları ve membran bütünlüğünün korunması için gerekli olan unsurlardır (Anonim, 2005, Anonim, 2005, Maxwell ve Johnson 1999, Rossi ve ark, 1997).

Seminal plazma; koruyucu ve besleyici özellik gösteren bir sulandırıcıdır. Bu sulandırıcı spermatozoanın fertilitatesini muhafaza eder ve motiilitesini artırmada önemli bir yere sahiptir. Buffer ajanlar (örneğin: bikarbonat) seminal vezikül tarafından üretilir. Enerji substratlarından Fruktoz ve Sorbitol seminal vezikül, Gliserilfosforilkolin (GPC) ise epididimis tarafından üretilir. Koç ve boğa spermasında bulunan fruktoz diğer evcil türlere nazaran daha yüksektir. Seminal plazmanın pH'sı boğa ve koçlarda hafif asidik, domuz ve aygırlarda ise hafif alkaliktir. Ozmotik basınç ise kanın osmotik basıncına benzer özelliktedir (Duru, 2001, Rigby ve ark, 2001).

Seminal plazmanın içeriğinde bulunan, spermeler için oldukça önemli yere sahip olan bir çok element vardır. Bunlar çinko, bakır, demir, kurşun, kadmiyum, nikel, selenyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, sodyum ve potasyumdan oluşmaktadır.

Seminal plazmada bulunan proteinler, spermeler için koruyucu bir örtü görevi görmektedir. Aynı zamanda spermelerin yaşam sürelerini artırdığı bilinmekle birlikte, fertilizasyon ve kapasitasyon işlemlerinde rol oynarlar. Bu sulandırıcıda bulunan proteinlerin isimleri şunlardır; kalsiyum bağlayan proteinler, çinko bağlayan proteinler, heparin bağlayan proteinler, laktoferrin, transferin, CRISP proteinleri (Cystein Rich Secretory Proteins), hormonlar, enzimler aminoasitler ve poliaminlerden oluşmaktadır.



### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Bu araştırmada Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliğinde bulundurulan Kangal Akkaraman ırkı 24-36 aylık 8 adet koçtan alınan spermalar kullanılmıştır. Koç çalışmasının yapılacağı gün, sperması alınan koçlar birbirleri arasında rastgele seçilmiştir. Koçların bakım ve beslenmesi Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliğinden sorumlu görevliler tarafından gerçekleştirilmiştir.

Koçlardan spermalar elektro ejakülatör (EE) yardımı ile alınmıştır. Kullanılan alet ve malzemeler Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

#### **3.2. Spermanın Alınması**

Koçlardan sperma EE yöntemiyle alınmıştır. Bu işlem esnasında koç bir yanı üzerine yatırıldı. Koçun ön ayakları ile başı ön tarafa, arka ayakları da arka tarafa doğru gerdirilerek hareketi sınırlandırıldı. Prepisyum da bulunan fazla kıllar kırılarak uzaklaştırıldı ve uç kısmı kâğıt havlu ile temizlendi. EE'nin probuna kayganlaştırıcı jel sürülerek koçun rektumuna yerleştirildi. Probun dışta kalan kısmına bastırılarak ön taraftaki elektrotların, sacrumun alt kısmında, ek salgı bezlerinin üst kısmında bulunan ve genital organları innerve eden sinirlere temas etmesi sağlandı. Bu sırada bir yardımcıda spermayı almak için toplama kadehini prepitiumun ucuna yakın tutarak bekler. Elektro-ejakülatör çalıştırdıktan sonra 3-4 Volt'luk düşük voltajlarla başlayıp 2'şer Volt'luk artışlarla 5-7 saniye aralıklarla 8-10 saniye uyarımlar verilerek ortalama 6-7 uyarım sonucu ereksiyon ve ejakülasyon sağlandı. En çok 10-12 Volt'luk uyarım verilmiştir. Sperma toplama kadehine alınan spermalar gerekli muayenelerin yapılabilmesi için 28 °C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirildi.



### **3.3. Spermanın Muayenesi**

Sperma numunelerinin muayenesinde kullanılan bütün cam ve plastik malzemeler önce sterilize edildi ve sonra muayene işlemine geçildi. Çalışmada, 8 adet koçtan birer ejakulat alındı ve pooling yapılarak kullanıldı. Koçlardan sperma alındıktan sonra elde edilen ejakulatların makroskopik ve mikroskopik muayeneleri yapıldı.

### **3.4. Makroskopik Muayene**

#### **3.4.1. Spermanın rengi**

EE yardımı ile toplanan spermaların rengi, alınan tüpte, çıplak gözle bakılıp 1-5 aralığında numaralandırılarak değerlendirildi. Bu değerlendirmeye göre 5 çok koyu, 4 krema koyuluğu, 3 sulu krema, 2 süt inceliği ve 1 de sulu olarak değerlendirildi (Evans ve Maxwell, 1987).

#### **3.4.2. Sperma miktarı**

Koçlardan ejakulatlar sperma miktarının belirlenmesi için derecelendirilmiş bir toplama kadehine alındı ve ölçümü yapıldı. Sperma miktarı mililitre (ml) olarak hesaplandı (İleri, 2002).

#### **3.4.3. Spermanın pH değeri**

Spermanın pH değeri, pH indikatör kâğıdı kullanılarak (pH 5,5–9,0 Merck) belirlendi (İleri, 2002).

### **3.5. Mikroskopik Muayene**

#### **3.5.1. Sperm motilitesi**

Muayene edilecek spermanın lam üzerindeki küçük bir damlası üzerine lamel kapatılarak, faz-kontrast ısıtma tablalı mikroskopta x200 büyütmede en az üç değişik mikroskop sahasında muayene edilerek her alandaki ileri yönde güçlü düzgün doğrusal hareket eden spermlerin diğerlerine (duran, titreşen, küçük, büyük daireler çizen) oranı saptandı. Bulunan ortalama değer yüzde (%) olarak ifade edildi (İleri, 2002).

#### **3.5.2. Spermanın yoğunluğu**

Bu çalışmada sperma yoğunluğu tespitinde fotometrik yöntem kullanıldı, 40 µl nativ spermadan alınan numune 3960 µl NaCl solüsyonu ile 1/100 oranında sulandırılarak fotolometreye (IMV-Accucell) yerleştirildi.

#### **3.5.3. Anormal sperm oranı**

Bu çalışmada sıvı fikzasyon yöntemi kullanıldı. Sonuçlar her sperma örneğinde 400 sperm incelenerek belirlendi.

#### **3.5.4. Ölü-canlı sperm oranı**

Ölü- canlı sperm oranını belirlemek için % 3'lük Na sitrat ile hazırlanmış, % 2'lik eosin boyası kullanıldı. Lam üzerine konulan bir damla spermanın yanına birkaç kat büyüklükte eosin boyası konur, boya ile sperma lamel aracılığı ile karıştırılarak hızlıca froti çekildi ve fikzasyon amacı ile hazırlanan frotiler sıcak tablada hızla kurutuldu. Hazırlanan preparatlar mikroskopta x400 büyütmede 400 sperm sayılarak değerlendirildi. Ölü sperm oranı yüzde (%) olarak ifade edildi. Preparatların değerlendirilmesinde baş kısmı boya alan spermler ölü, baş kısmı boya almamış spermler canlı olarak değerlendirildi (İleri ve Alaçam, 1994).

### 3.6. Grupların Belirlenmesi ve Muayeneler

Koçlardan sperma alındıktan sonra 28 °C'lik su banyosuna alındı, spermatolojik muayeneler yapıldı. Spermatolojik muayenelerden sonra, kontrol, 60 °C'lik ve 80 °C'lik 3 gruba ayrıldı. Daha sonra spermaların seminal plazmasını ayırmak için 5000 devirde 10'ar dakika santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrası spermadan ayrılan seminal plazma 2. Grup için 60 °C'lik etüvde, 3. Grup için 80 °C'lik etüvde 10 dakika bekletildi, tekrar soğutulularak spermaya katıldı. Bu işlemler sonrasında 28 °C'de tutulan spermalar +4 °C'ye alındı. Bu ortamda motilite, canlı/ölü sperm oranı ve anormal sperm oranları verileri periyodik olarak kaydedildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Koçların Spermatolojik Parametreleri

Çalışma için rastgele belirlenen 8 adet koçtan spermalar alınmıştır. 2 hafta boyunca alınan spermalar kullanılmamış, sonrasında alınan spermalar muayene edilerek kullanılmıştır. Tüm koçlardan alınan sperma verilerinin ortalaması Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Çalışma başında tüm koçlardan alınan spermaların spermatolojik parametreleri.

Renk	Miktar (ml)	pH	Motilite (%)	Yoğunluk ( $10^9$ /ml)	Anormal (%)	Ölü-Canlı (%)
Koyu krem	2,46±0,69	6,24±0,31	85±4,17	1,9x10 <sup>9</sup> ± 0,41 /ml	5,87±0,83	6,37±0,74

Sekiz adet koçtan alınan sperma numunelerinin başlıca spermatolojik özellikleri birlikte değerlendirilerek kontrol grubu, 60 °C'lik grup ve 80 °C'lik grup olarak isimlendirilerek üç gruba, 4'er ml olacak şekilde ayrıldı. Sperma rengi, koyu krem olarak tespit edildi. Sperma miktarları koç başına 2,46 ml olarak tespit edildi. pH değeri ortalama 6,24 bulundu. Sperm motilitesi, spermalar alındıktan hemen sonra hiçbir işlem yapılmadan ortalama % 85 olarak belirlendi. Sperma yoğunluğu fotometrik yöntem kullanılarak, 40 µl nativ spermadan alınan numune 3960 µl sodyum klorür solüsyonu ile 1/100 oranında sulandırılarak fotolometreye (IMV-Accucell) yerleştirildi ve sonuçlar 1,9x10<sup>9</sup> /ml olarak saptandı. Anormal sperma oranına sıvı fiksasyon yöntemi ile bakılmış ve en az 333 hücre sayılarak % 5,87 olarak belirlendi. Ölü canlı sperm oranı ise % 3'lük sodyum sitrat ile hazırlanıp, % 2'lik eosin boyası kullanılarak bakıldı ve % 6,37 olarak kaydedildi.

### 4.2. Spermanın Gruplara Ayrılması ve Muayene Süreci

Koçlardan alınan spermalar 28 °C'lik su banyosuna alındı, 1. Grup kontrol grubu olarak belirlendi. 2. Grup 60 °C'lik grup, bu gruptaki sperma 4 ml'lik bir adet tüp içerisinde seminal plazmasını ayrılması için 5000 devirde 10 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrası spermadan ayrılan seminal plazma 60 °C'lik etüvde 10 dakika

bekletildi, tekrar 28 °C'ye soğutularak spermaya katıldı. 3. Grup 80 °C'lik gruptur. Bu gruptaki sperma 4 ml'lik bir tüp içerisinde seminal plazmasını ayrılması için 5000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spermadan ayrılan seminal plazma 80 °C'lik etüvde 10 dakika bekletildi, tekrar 28 °C'ye soğutularak spermaya katıldı. Bu işlemlerin sonunda tüm gruplar kısa süreli saklama koşulları sağlanması için +4 °C'ye kademeli olarak (dakika da 1°C olacak şekilde) soğutuldu, periyodik motilite, canlı/ölü sperm oranı ve anormal sperm oranları tespit edildi. Motilite muayenesi ve canlı/ölü oranı kontrolü saati geldiğinde, anormal sperm oranı için ise hazırlıklar yapıp numuneler Hancock solüsyonu içerisinde alınarak daha sonra incelendi.

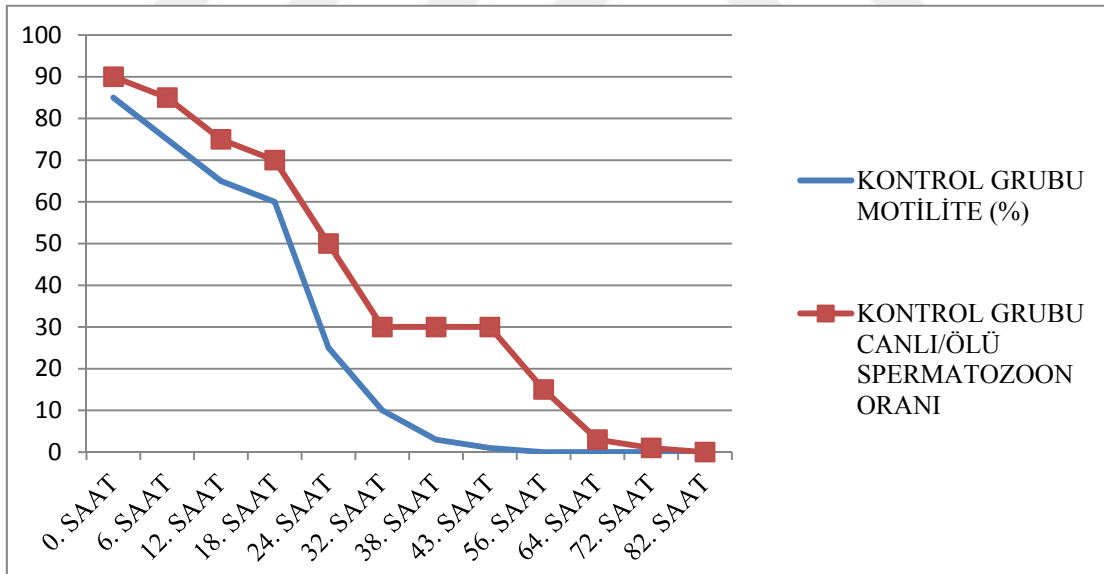
Tablo 3: Kontrol grubunda Motilite ve Canlı / Ölü Sperm oranı.

Spermatolojik Parametreler	Kontrol Grubu	
	Motilite (%)	Canlı / Ölü Sperm Oranı (%)
0. Saat	85	90
6. Saat	75	85
12. Saat	65	75
18. Saat	60	70
24. Saat	25	50
30. Saat	10	30
36. Saat	5	30
42. Saat	0	30
48. Saat	0	25
54. Saat	0	15
60. Saat	0	3
66. Saat	0	2
72. Saat	0	1
82. Saat	0	0

Tablo 4: Kontrol grubunda saatlere göre normal ve anormal sperm oranları.

Kontrol Grubu	Baş Ano. (%)	Orta Kısım Ano. (%)	Kuyruk Ano. (%)	Normal Sper. (%)
0. Saat	0,26	0,23	9,51	90,10
6. Saat	0,38	0,62	9,27	89,73
12. Saat	0,33	0,63	9,92	89,12
18. Saat	0,35	0,5	10,15	88,50
24. Saat	0,33	0,87	10,60	88,20
30. Saat	0,40	0,48	11,60	87,52
36. Saat	0,26	0,75	11,64	87,35
42. Saat	0,32	0,64	12,34	86,70
48. Saat	0,20	1,38	12,25	86,17
54. Saat	0,18	0,74	17,74	81,33
66. Saat	0,23	0,68	18,95	80,14
74. Saat	0,45	0,45	16,37	82,74
88. Saat	0,37	0,55	17,31	81,77
104. Saat	0,68	1,36	18,18	79,77

Çizelge 1: Kontrol grubu spermatolojik değerlerin zamana göre değişimi.



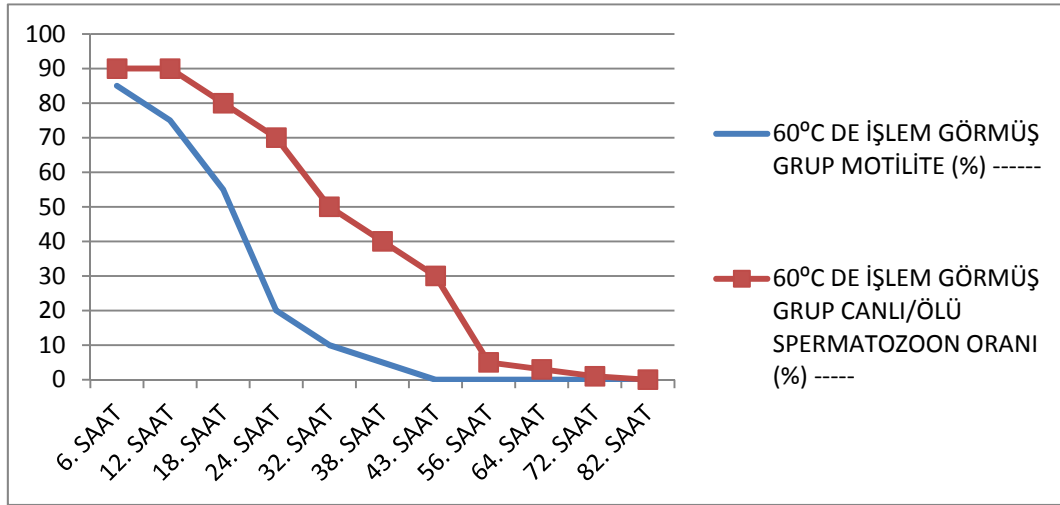
Tablo 5: Grup 2'de Motilite ve Canlı / Ölü Sperm oranı.

Spermatolojik Parametreler	60 °C'de İşlem Görmüş Grup	
	Motilite (%)	Canlı/Ölü Sperm Oranı
Saat		
0. Saat	-----	-----
6. Saat	85	90
12. Saat	75	90
18. Saat	55	80
24. Saat	20	70
30. Saat	10	50
36. Saat	5	40
42. Saat	0	30
48. Saat	0	30
54. Saat	0	5
60. Saat	0	5
66. Saat	0	3
72. Saat	0	1
82. Saat	0	0

Tablo 6: Grup 2'de saatlere göre normal ve anormal sperm oranları.

60 °C'lik Grup	Baş Ano. (%)	Orta Kısım Anor. (%)	Kuyruk Anor. (%)	Normal Sper. (%)
0. Saat	0,10	0,20	9,10	90,60
6. Saat	0,15	0,20	11,15	88,50
12. Saat	0,15	0,25	11,20	88,40
18. Saat	0,20	0,50	12,95	87,35
24. Saat	0,20	0,50	12,20	87,10
30. Saat	0,25	0,50	13,00	86,25
36. Saat	0,25	0,60	14,40	84,75
42. Saat	0,25	0,65	17,50	81,60
48. Saat	0,15	0,64	17,86	81,35
54. Saat	0,43	0,86	21,08	77,63
66. Saat	0,22	0,45	18,88	80,45
74. Saat	0,23	0,46	21,79	77,52
88. Saat	0,21	0,84	17,02	81,93
96. Saat	0,22	0,87	14,53	84,38
104. Saat	0,22	1,53	14,73	83,52

Çizelge 2: Grup 2'de spermatolojik değerlerin zamana göre değişimi.



Tablo 7: Grup 3'de Motilite ve Canlı / Ölü Sperm oranı.

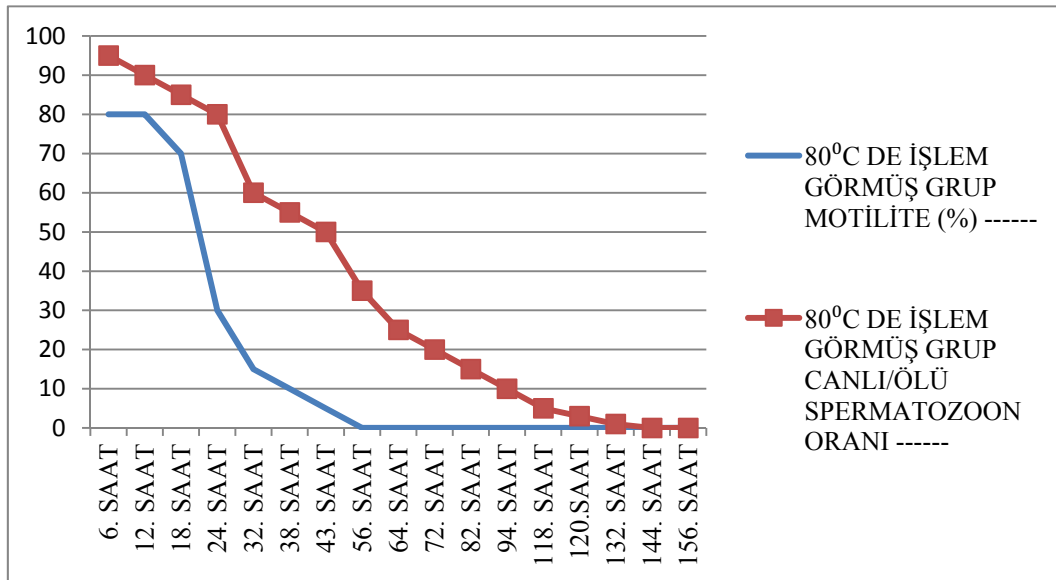
Spermatolojik Parametreler	80 °C de İşlem Görmüş Grup	
	Motilite (%)	Canlı / Ölü Sperm Oranı
Saat	-----	-----
0. Saat	-----	-----
6. Saat	80	95
12. Saat	80	90
18. Saat	70	85
24. Saat	30	80
30. Saat	15	60
36. Saat	10	55
42. Saat	5	50
48. Saat	5	45
54. Saat	0	35
60. Saat	0	30
66. Saat	0	25
72. Saat	0	20
82. Saat	0	15
94. Saat	0	10
118. Saat	0	5
120. Saat	0	3
132. Saat	0	1
144. Saat	0	0
156. Saat	0	0



Tablo 8: Grup 3'de saatlere göre normal ve anormal sperm oranları.

80 °C'lik Grup	Baş Ano.(%)	Orta Kısım An. (%)	Kuyruk An. (%)	Normal Sper. (%)
0. Saat	0,18	0,22	6,20	93,40
6. Saat	0,18	0,22	6,75	92,85
12. Saat	0,18	0,24	6,48	93,10
18. Saat	0,20	0,24	6,70	92,86
24. Saat	0,19	0,30	6,86	92,65
30. Saat	0,20	0,35	7,20	92,25
36. Saat	0,20	0,40	7,75	91,65
42. Saat	0,21	0,29	8,95	90,55
48. Saat	0,21	0,22	6,71	92,86
54. Saat	0,24	0,48	6,25	93,03
66. Saat	0,22	0,25	12,54	86,99
74. Saat	0,23	0,24	6,21	93,32
88. Saat	0,23	1,10	12,11	86,56
96. Saat	0,25	0,87	11,73	87,15
104. Saat	0,27	1,10	13,06	85,57
112. Saat	0,29	0,40	10,89	88,42
120. Saat	0,28	0,35	13,01	86,36

Çizelge 3: Grup 3'de spermatolojik değerlerin zamana göre değişimi.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda koyunlarda suni tohumlama yapabilmek için çalışmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Ancak eritilmiş sperma ile yapılan servikal tohumlamalar, düşük kuzulama oranı ve fertilizasyon problemleri ile sonuçlanmaktadır. Uygun sulandırıcılar, donma ve eritme aşamalarında spermleri korur. Süt proteini (lakto-albümin) ve yumurta sarısının spermlerin motilite ve canlılığını artırdığı ve koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Ollero ve ark., 1997; Salamon ve Maxwell 1995a; Salamon ve Maxwell, 1995b; Söderquist ve ark., 1999; Watson P.F. 1995). Fertilizasyonun başarılı olabilmesi için dondurulmuş spermanın, eritme sonrası, yeterli sayıda motil spermin servikal bariyeri geçmesi zorunludur (Curry ve ark., 2000; Holt W.V 2000b; Ollero ve ark., 1998). Servikal tohumlamalarda başarılı sonuç elde edilebilmesi için kabul edilebilir uygun doz  $200 \times 10^6$  sperm olarak bildirilmiştir (İleri, Alçam, 1994).

Gerçekleştirilen çalışmada erkek eklenti bezleri içerisindeki proteinlerin ve enzimlerin fonksiyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla alınan spermalar hiçbir işlem yapılmayan kontrol, eklenti bezleri sıvılarının spermadan ayrılarak 10 dakika boyunca  $60^{\circ}\text{C}$  ısı uygulanan ve aynı şekilde  $80^{\circ}\text{C}$  ısı uygulanan 2 deneme grubuna ayrılmıştır. Eklenti bezleri içerisindeki proteinlerin ve enzimlerin, denatüre olması için farklı ısı seçimleri yapılmıştır. Proteinler ve enzimler denatüre olduktan sonra spermlerin yaşam ömrünü nasıl etkilediği araştırılmıştır. Deneme gruplarından, seminal plazmasına  $80^{\circ}\text{C}$  ısı uygulanan grup bunun bir göstergesi olarak en uzun süre canlılığını muhafaza eden grup olmuştur (Tablo 7).

Rete testis, epididimis ve eklenti üreme bezlerinde üretilen fizyolojik bir sekresyon olan sıvıya seminal plazma denir. Organik ve inorganik komponentlerin kompleks bir karışımıdır ve içeriğinde bulunan spesifik çeşitli biyokimyasal bileşenleri sayesinde spermlerin fonksiyonlarını düzenlemektedir (Tombi, 2006). Yanagimachi (1994), ejakulasyonda sperm ile seminal plazmanın temas ettiğini, seminal plazmadaki koruyucu faktörlerin sperm yüzeyine bağlandığını ve bu faktörlerin hücreden uzaklaştırılmasına kadar erken kapasitasyon olaylarının önlendiğini bildirmiştir. Perez ve ark. (1997), kapasitasyonu önleyen bu faktörlerin bazı spermlerde

daha az olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sperm yüzeyinden erken ayrılıp spermelerin kapasitasyona maruz kaldığını da ifade etmişlerdir (Perez ve ark., 1997).

Seminal plazmadaki koruyucu maddeler genellikle proteinlerdir. Koç ve boğa spermelerin motilitesini ve yaşama kabiliyetini artıran en önemli öğelerden biri seminal plazmadır (Fewlass ve ark., 1975; Maxwell ve ark., 1997; Maxwell ve ark., 1998; Ollero ve ark., 1997; Schöneck ve ark., 1996). Motiliteyi stimüle eden bu faktörler, seminal plazmadaki düşük molekül ağırlıklı fraksiyonlardır (Bass ve ark., 1983). Çalışmamızda kontrol grubunda motilitenin yaklaşık 18. saatlere kadar %50'lere kadar düşmesi 24. saatte %20 motilite olması genital kanal sıvıları olmaksızın sperma içerisinde bulunan eklenti bezi sıvılarının katkısıyla olmaktadır. Eklenti bezlerinin sıvıları beslenme, enerji ve destek olmanın yanısıra spermanın uzun süre canlı kalmasını sağlayacak birçok maddeyi de içerisinde bulundurmaktadır.

Seminal plazma, soğuk şokuna maruz kalma riski olan spermelerin riskini azaltır (Perez ve ark., 2001; Perez ve ark., 2002), membran hasarlarını önler (Barrios ve ark., 2000; Barrios ve ark., 2005) ve soğutmanın indüklediği kapasitasyon benzeri olayları engeller (Maxwell ve ark., 1999; Schembri ve ark., 2002; Vadnais ve ark., 2005). Seminal plazmanın yokluğunda ise kapasitasyon benzeri değişimler akrozom reaksiyonu ile sonuçlanır (Oliphant ve ark., 1985; Schembri ve ark., 2002). Gerçekleştirilen çalışmada akrozom reaksiyonu ile ilgili bir test yapılmamıştır.

Troedsson ve ark. (2005), seminal plazmanın, spermelerin dişi genital kanalındaki transportunda ve canlılığını sürdürmesinde aktif rol oynadığını bildirmişler ayrıca seminal plazmasız donma işlemi sonrası sperm transportunun olumsuz yönde etkilendiğini açıklamışlardır. Alghamdi ve Foster (2005), seminal plazmadaki DNAase enziminin, nötrofil DNA'larını sindirdiğini ve bu sayede daha fazla sperm ovidukta ulaşabildiğini bildirmişlerdir. Yudin ve ark. (2005), seminal plazmadaki Betadefensin 126 (DEFB126) proteinin, kapasitasyon tamamlana kadar sperm yüzeylerini tamamen örttüğünü belirtmişlerdir. Kapasitasyon anında ya da kapasite olmuş spermelerde bu protein ortamından uzaklaştırılırsa immün sistem tarafından hemen tanınarak elimine edildiğini ifade etmişlerdir (Yudin ve ark., 2005).

Maxwell ve ark. (1999), eritilmiş koç spermasına % 30 seminal plazma eklemişler ve intraservikal tohumlama sonrası kontrol ve seminal plazmalı gruplarda sırasıyla; % 24,3 ve % 60,0 gebelik saptamışlardır. Araştırmacılar seminal plazmanın eritme sonrası spermelerde oluşan olumsuzlukları önlediğini ve dolayısıyla yüksek fertilitite oranlarının elde edildiğini açıklamışlardır (Maxwell ve ark., 1999). Araştırmacılar eritilmiş spermaya seminal plazma ekleyerek tohumlama gerçekleştirmişlerdir. Seminal plazma genital kanal sıvıları ile birlikte fertilizasyonu arttırmıştır. Eklenti bezinin asıl kötü etkisi spermanın dondurulma aşamasında ortaya çıkmaktadır.

Ollero ve ark. (1997), koç spermasındaki seminal plazmayı bir filtreleme yöntemi ile filtrelemişlerdir. Daha sonra Fisher sulandırıcısı ile spermayı dondurmuşlardır. Araştırmacılar her iki grupta da eritme sonrası spermelerin canlılığını koruduğunu bildirmişlerdir. Seminal plazmanın yerine eklenen Fisher sulandırıcısı ile dondurmanın spermanın canlılığına olumsuz etkinin olmaması spermanın dondurulması sırasında eklenti bezlerinin kötü etkilerinden spermanın etkilenmemesidir. Bizde araştırmamızda sperma içerisinde bulunan eklenti bezlerinin kötü etkilerinin bertaraf edilmesi amacıyla ısı uygulaması yapılmış ve spermanın canlılığının 60 C ve 80 C lik gruplarda kontrol grubuna göre daha uzun sürdüğü belirlenmiştir.

Seminal plazmanın her zaman kötü etkilerinin olmadığı, özellikle dişi genital kanalda veya dondurulup çözdürülen spermanın korunmasında önemli etkisi olduğu çalışan araştırmacılar vardır.

Seminal plazmanın uzaklaştırılması ile yapılan çalışmalarda da bizim çalışmamızdaki gibi iyi sonuçlar ortaya çıkmıştır. Belibasaki ve ark. (2000), donma öncesi süt tozlu koç sperma sulandırıcılarına %50 seminal plazma ilavesinin fertilitete etkisini araştırmışlar, seminal plazma ilavesinin tohumlama sonrası fertilitite oranlarını artırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda seminal plazma her ne kadar uzaklaştırılmasa da ısı etkisi ile birçok enzim denatüre edilmiştir. Bu çalışma bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

Gerçekleştirilen çalışmada; hiçbir işlem yapılmayan 1. Grup (Kontrol) ta, motilite değerinin % 85'ten 32 saat sonra % 10'a düştüğü izlenmiştir. 2. Grupta koç

seminal plazmasının spermadan uzaklaştırılması ve 60 °C'de 10 dakika tutulup 28 °C'de tekrar spermaya eklenmesi ile kontrol grubuna göre motilitenin süresinde herhangi bir değişiklik olmamış yine 32. saatte % 10'a düşmüştür. Fakat 3. grupta, koç seminal plazmasının spermadan uzaklaştırılıp, 80 °C'de 10 dakika tutulup 28 °C'de tekrar spermaya eklendiği grupta, 32. saatte motilitenin % 15 olduğu ve 38. saatte % 10 motiliteye düştüğü izlenmiştir. Aradaki farkın daha iyi anlaşılabilmesi açısından 32. saatteki canlı / ölü sperm oranları daha ilgi çekicidir. Canlı ölü muayenesinde 32. saat muayeneleri incelendiğinde kontrol grubunda % 30, 2. grupta % 50, 3. grupta ise %60 gibi bir sonuç elde edilmiştir. Normal sperm oranları açısından da 3. grup öne çıkmaktadır. Kontrol grubunda 48. saatte normal sperm oranı % 86,17, 2. grupta % 80,85 iken 3. grupta % 92,86 gibi bir yüzde değer saptanması önemlidir.

Sonuç olarak; Kontrol grubu ile bu gruplar karşılaştırıldığında verileri en iyi grubun 3. grup olması sperma içerisinde seminal plazmanın ihtiva ettiği çeşitli proteinlerin denatürasyonu ile yaşam süresinin, anormalliklerin ve motilitenin doğru orantılı etkilendiğini kanıtlar niteliktedir. Bundan sonraki koç spermasının dondurulması ile ilgili çalışmalarda eklenti bezi sıvılarının 80 °C'de 10 dakika bekletilerek tekrar spermaya eklenmesi ile iyi sonuçlar alınabileceği kanaatine varılmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- Aboagla, E.M., Terada, T. (2003). Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*,69(4):1245-1250.
- Aisen, E.G., Medina, V.H., Venturino, A. (2002) Cryopreservation and post- thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7):1801-1808
- AK, K., İleri, İ.K., Horoz, H., Şenünver, A., Alkan, S., Rahimi, H., Kaşıkçı, G. (1994). Kıvrıkcık koyunlarında mevsim içi östrus senkronizasyonu İ Ü Vet Fak Derg, 20(2-3).
- AK, K. (1994b). Spermanın saklanması. Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Masaüstü Yayıncılık Ünitesi. Ders Notu No: 23 9. Bölüm
- Ak, K., Ak, S., Gürel, A., Hasöksüz, M., Baran, A. (1995). Koçlarda mycoplasma agalactiae'nin spermatolojik özelliklere deneysel araştırmalar. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 26 (2), 139-155.
- Ak, K. (2000). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İ Ü Vet Fak Yayını.Ders Notu No:112.İstanbul.pp; 69, 76, 102, 196-197.
- Alaşam, E.(1990). Theriogenoloji, "Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'i Tohumlama Obstetrik ve İnfertilite". Nurol matbaacılık A.Ş. Ankara.
- Alghamdi, A.S., Foster, D.N. (2005). Seminal plasma DNase frees spermatozoon entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod*. 73(6),1174-1181.
- Anonim,(2005)Epididymis, Ejaculation. [www.wisc.edu/ansci\\_repro/lec/handouts/hd6.html](http://www.wisc.edu/ansci_repro/lec/handouts/hd6.html).
- Anonim (2005) The epididymis and Ejaculation.[www.wisc.edu/ansci\\_repro/lec/handouts/hd6.html](http://www.wisc.edu/ansci_repro/lec/handouts/hd6.html).
- Anonim-2. (2009). Liquid nitrogen-code of practice. Birckbeck University of London. Health and Safety Services. Erişim: <http://www.bbk.ac.uk/so/policies/liqn2>. Erişim Tarihi: 13.04.2009.
- Anonim-5. (2009). At -152°C World's lowest temperature.Erişim Adresi: [http://www.sanyobiomedical.com/files/PDF\\_bestanden/PDF\\_conservation/SANYO%20MD F-1155.pdf](http://www.sanyobiomedical.com/files/PDF_bestanden/PDF_conservation/SANYO%20MD F-1155.pdf). Erişim Tarihi: 12.01.2009.

- Arthur, H.G., Noakes, D.E., Pearson, H., Parkinson, T.J. (1996). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 7th edition. WB Saunders Company Limited. London England. P: 634-659
- Bailey, J.L., Morrie, A., Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: success and persistent in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*, 83:393-401.
- Avdatek, T. (2013). Koç spermasına katılan bazı antioksidanların dondurma ve çözündürme sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve dna hasarı üzerine etkileri.
- Bakas, L.S., Disalvo, E.A. (1991). Effect of Ca<sup>2+</sup> on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* 1991;28(4):347-353.
- Barrios, B., Perez-Pe, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muino-Blanco, T. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod*, 63,1531-1537.
- Barrios, B., Fernandez-Juan, M., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez. J.A. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoon against cold shock. *J.Androl*, 26(4),539-549 (Abstr).
- Bass, J.W., Molan, P.C., Shannon, P. (1983). Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoon. *J Reprod Fertil*, 68,275-280.
- Belibasaki, S., Amiridis, G.S., Lymberopoulos, A., Varsakeli, S., Kouskoura, T. (2000). Ram seminal plasma and fertility: Results from an on going field study. *Acta Veterinaria Hungarica*, 48,(3),335-341.
- Bielanski, A., Davis, S.N., Sapp, T., Wallace, C.L. (2000). Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology*.40:110-116.
- Bielanski, A., Bergeron, H., Lau, P.C.K., Devenish, J. (2003). Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*.46:146-15
- Bucak, M.N., 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*, 67(5):1060-1067.
- Bucak, M.N., Tekin, N. (2008). Ankara tekesi spermasının dondurulmasında bazı kriyoprotektanların etkisi. *Lalahan hayvansal araştırma enstitüsü dergisi*, 48(2):59-66.

- Buhr, M.M., Curtis, E.F., Kakuda, N.S. (1994). Composition and behavior of head membrane-lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 31(3):224-238.
- Burden, D.W. (1999). Issues in contamination and temperature variation in the cryopreservation of animal cells and tissues. Application Note 99-08 Erişim Adresi: <http://www.revco-sci.com/documents/Cryo%20Paper.doc>. Erişim Tarihi: 12.06.2005
- Cabria, E., Anel, L., Herraetz, M.P. (2001). Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 54(4):623-635.
- Cameron, C.D. (1997). The Effect Method of Stimulation on Response to Electro-ejaculation. *Aust. Vet. J.*, 58: 380-383.
- Chen, Y., Foote, R.H., Brockett, C.C. (1993). Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30(4):423-431.
- Choong, C.H., Wales, R.G. (1962). The effect of cold shock on spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, 15:543-551.
- Clarke, G.N. (1999). Sperm cryopreservation: is there a significant risk of crosscontamination? *Human Reproduction*. 14(12):2941-294
- Curry, M.R., Millar, J.D., Watson, P.F. (1994). Calculated optimal cooling Rates for Ram and Human Sperm Cryopreservation fail to conform with Empirical observations. *Biol Reprod*, 51, 1014-1021.
- Curry, M.R., Millar, J.D., Tamuli, S.M., Watson, P.F. (1996). Surface area and volume measurement for ram and human spermatozoon. *Biol Reprod*, 55, 1325-1332.
- Curry, M.R., Kleinhans, F.W., Watson, P.F. (2000). Measurement of water permeability of the membrane of boar, ram and rabbit spermatozoon using concentration dependent self quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiology*, 41,167-173.
- Cupps, T.P. (1991). Semen Production and Collection. *Reproduction in Domestic Animals* (Ed. T.P. Cupps). Academic Press, Inc., California, 252-255.
- Çevik, M., Tuncer B.P.(2005).Evcil hayvanlarda seminal plazmanın fiziko-kimyasal yapısı ve üreme fonksiyonları üzerindeki etkileri. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.* 2005, 45 (2) 63 – 72



- D'Alessandro, A.G.D., Martemucci, G., Collanna, M.A., Bellini, A. (2001). Post thaw survival of ram spermatozoon and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, 55,1159-1170.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G. (2005). Post-thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of Lecce rams frozen in different seasons with a milkegg yolk extender. *Italian J Anim Sci*,4, 139-148.
- Demirci, E. (2007). Evcil hayvanlarda reproduksiyon, suni tohumlama ve androloji ders notları.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Sydney; Butterworths. pp 19, 91-141.
- Farshad, A., Akhondzadeh, S. (2008). Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, 21(12):1721-1727.
- Fewlass, T.A., Sexton, G.W., Shaffner, C.S. (1975). Effect of various levels of egg yolk, milk and seminal plasma or blood serum on the respiration and reproductive efficiency of chicken spermatozoa. *Poultry Science*,54, 346-349.
- Fiser, P.S., Fairfull, R.W. (1986). Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoon. *Theriogenology*, 25(3),473-484.
- Fiser, P.S., Fairfull, R.W. (1986). The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoon before and after freezing. *Cryobiology*, 23,518-524.
- Fountain, D., Ralston, M., Higgins, N., Gorlin, J.B., Uhl, L., Wheeler, C., Antin, J.H., Churchill, W.H., Benjamin, R.J. (1997). Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion*. Jun;37(6):585-91.
- Gil, J., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. (2000). Influence of centrifugation and different extenders on post thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, 54,93-108.
- Gökçen, H., Çamaş, H., Erdinç, H., Şener, E., Aştı, R.N., Çekgöl, E. (1990). Koçlarda rasyona ve spermaya katılan vit.E ve selenyumum dondurulmuş spermatozoonların akrozom morfolojisi,enzim aktivitesi ve döl verimi üzerine araştırmalar. *Doğa*, 14, 207-218.

- Gökçen, H., Aştı, R.N., Çekgöl, E., Şener, E. (1995). Prostaglandin F<sub>2</sub>alfa ve Vit.E katılarak dondurulan koç spermalarında akrozom morfolojisi ve döl verimi üzerinde araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4:1-3.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11(1):73-88.
- Holt, W.V., North, R.D. (1986). Thermotropic phase-transitions in the plasma-membrane of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78(2):447-457.
- Holt, W.T. (2000b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1):47-58.
- Isachenko, V., Montag, M., Isachenko, E., Zaeva, V., Krivokharchenko, I., Shafei, R., Ven, H. (2005). Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Human Reproduction*.20(2): 492-496
- İleri, İ.K. (1985). Koyunlarda bir PGF<sub>2</sub> $\alpha$  analogu olan Tiaprost(iliren) ile östrus senkronizasyonu ve sun'i tohumlama çalışmaları. *İ Ü Vet Fak Derg*, 11 (1), 15-30.
- İleri, İ.K., Ak, K., Pabuccuoğlu, S., Birler, S.(2002). Evcil hayvanlarda reproduksiyon ve suni tohumlama.
- İleri, İ.K. (1994). Erkek hayvanlarda infertilite: Ed. E. Alaçam: *Theriogenoloji*
- Kasai, M. (1996). Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4):67-75.
- Koshimoto, C., Mazur, P. (2002). Effects of cooling and warming rate to and from -70 degrees C, and effect of further cooling from -70 to -196 degrees C on the motility of mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 66(5):1477-1484.
- Könirsch, H.L., Collin, C., Sifer, C., Devaux, A., Kuttenn, F., Madelenat, P., Brun-Vezinet, F., Feldman, G., Benifla, J.L. (2003). Safety of cryopreservation straws for human gamete or embryos: a study with human immunodeficiency virus-1 under cryopreservation conditions. *Human Reproduction*. 18(1):140-144.
- Kuleshova, L.L., Shaw, J.M. (2000). A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. *Human Reproduction*.15(12):2604-2609
- Kyuwa, S., Nishikama, T., Kaneko, T., Nakashima, T., Kawano, K., Nakamura, N., Noguchi, K., Urano, T., Itoh, T., Nagagata, N. (2003). Experimental evaluation

- of cross-contamination between cryotubes containing mouse 2- cell embryos and murine pathogens in liquid nitrogen tanks. *Exp. Anim.* 52(1) : 6770
- Lebouf, B., Restall, B., Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci*, 62: 113-141.
- Leeuw, F.E.D., Leeuw, A.M.D., Daas, J.H.G., Colenbrander, B.V., Erkleij, A.J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30(1):32-44.
- Leibo, S.P., Brandley, L. (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: C Gagnon (Ed), *The Male Gamet*. Cache River Press: St Louis, p.502-515.
- Liu, Z., Foote, R.H., Brockett, C.C. (1998). Survival of Bull Sperm Frozen at Different Rates in Media Varying in Osmolarity. *Cryobiology*, 37(3):219-230.
- López-Sáez. A., Ortiz, N., Gallego, L., Garde, J.J. (2000). Liquid storage (5 degrees C) of ram semen in different diluents. *Archives of Andrology*, 44(2):155-164.
- Martin, I.C.A. (1966). Diluents for the preservation of ram spermatozoa. I. Diluents used at 37°C and 5°C containing casein. *Australian Journal of Biological Science*, 19:645-653.
- Mathur, A.K., Srivastava, R.S., Joshi, A., Kalra, D.B. (1989). Pellet freezing of ram semen. *Indian Journal of Animal Sciences*, 59(12), 1529.
- Mattner, P.E., Voglmayr, J.K. (1962). A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electroejaculator. *Aust J Exp Agric Anim Husband* 2, 78.
- Maxwell, W.M.C., Salamon, S. (1993). Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reproduction Fertility and Development*, 5(6):613-638.
- Maxwell, W.M.C., Watson, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 42, 55-65.
- Maxwell, W.M.C., Welch, R., Johnson, L.A. (1997). Viability and membrane integrity of spermatozoon after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, 8, 1165-1178.
- Maxwell, W.M.C., Long, C.R., Johnson, L.A., Dobrinski, J.R., Welch, G.R. (1998). The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoon after cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, 10, 433-440
- Maxwell, W.M.C., Evans, G., Mortimer, S.T., Gillan, L., Gellatly, E.S and Mcphie, C.A. (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-

- thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil*, 11, 123-126. (Abstr).
- Maxwell, W.M.C., Johnson, L.A. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52: 1352-1362.
- Mazur, P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14(3):251-272
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells- mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, 247(3):125-142.
- Mazur, P. (1990). Equilibrium, quasi- equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics*, 14, 53-92.
- McGann, L.E. (1978). Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology*, 15(4):382-390.
- McWilliams, R.B., Gibbons, W.E., Leibo, S.P. (1995). Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Human Reproduction*, 10(5):1163-1171.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliverira, A.T.D., Rodrigues, J.L. (2002). Current Status of Sperm Cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*.57,327344.
- Milovanov, V.K. (1951). Methods of storage of semen of ruminants. *News in the Biology of Reproduction of Farm Animals. Seljhozgiz, Moscow, in Russian*, pp. 139–165.
- Molinia, F.C., Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1994). Effects of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 36: 113-122.
- Moore, W.R. (1983-1984). A Comparison of Electroejaculation with the Artificial Vagina for Ram Semen Collection. *Annual Report. New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries*, 134.
- Morrell, J.M., Hodge, J.K. (1998). Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. *Animal Reproduction Science*, 53(1-4):43-63.
- Morris, G.J., Acton, E., Avery, S. (1999). A novel approach to sperm cryopreservation. *Human Reproduction*.14(4):1013-1021
- Mortimer, S.H., Maxwell, W.M.C. (2004). Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoon. *Reproduction*, 127, 285-291.
- Nolan, J.P., Hammerstedt, R.H. (1997). Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *The FASEB Journal*, 11(8):670-682.

- Nur, Z., Ak, K. (2003). Donmuş spermanın saklanması ve eritilmesi. Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.22(1-2-3):97-102
- Özkoca, A. (1965). Lalahan zootekni araştırma enstitüsünde yetiştirilen Merinos koçlarının ve Ankara keçisi tekelerinin spermatolojik özellikleri üzerine araştırmalar. L Z A E D, 5(1-2), 19-25.
- Oliphant, G., Reynolds, A and Thomas, T. (1985). Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. Am J Anat, 174, 269-283. (Abstr).
- Ollero, M., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T. (1997). Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. J Androl, 18 (6), 732-739. (Abstr).
- Ollero, M., Perez-pe, R., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J.A. (1998). Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. Cryobiology, 37, 1-12.
- Özkoca, A. (1984). Çiftlik hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İ.Ü Vet Fak Yayınları, İstanbul.
- Perez, L.J., Valcarcel, A., delas Heras, M.A., Moses, D and Baldassarre, H. (1997). The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of sub population of spermatozoa. Theriogenology, 47, 549-558.
- Perez-Pe, P., Cebrian-Perez, J.A and Muino-Blanco, T. (2001). Semen plasma proteins prevent cold shock membrane damage. Theriogenology, 56,425-434.
- Perez-Pe, R., Barrios, B., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T. (2002). Seminal plasma proteins reduce protien tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold shocked ram spermatozoon. Mol Reprod Dev, 61, 226-233.
- Pickett, B.W., Sullivan, J.J., Byers, M.S., Pace, M.M., Remmenga, E.E. (1973). Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoon. Fertil Steril, 26(2), 167-173.
- Platov, E.M. (1988). Cryopreservation of ram spermatozoa. Cryoconservation of Spermatozoa of Farm wx Animals. Agropromizdat, Leningrad, pp. 161–195, in Russian. Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S., 1949. Revival of spermatozoa.
- Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 164(4172):166.
- Pomares, C.C., Stojanov, T., Eppleton, J., Maxwell, W.M.C. (1994). Effect of glutathion peroxidase on the survival of goat and ram spermatozoa during liquid storage. Proc 7 th. Int Symp Spermatoz Abstr., 9; 24-28.

- Potts, R.J., Notarianni, I.J., Jefferies, T.M. (2000). Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat Res-Fund Mol M.*, 447: 249-256.
- Richards, A.B., Krakowka, S., Dexter, L.B., Schmid, H., Wolterbeek, A.P., Waalkens-Berendsen, D.H., Shigoyuki, A., Kurimoto, M. (2002). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*, 40(7):871-898.
- Rossi, T., Mazzilli, F., Sarandrea, N., Rapone, S., Dondero, F. (1997) The application of the differential pH method to the biochemical evaluation of seminal plasma, *Clinical Biochemistry*, 30(2):143-148.
- Salamon, S., Robinson, T.J. (1962). Studies on the artificial insemination of Merino sheep. II. The effects of semen diluents and storage on lambing performance. *Australian Journal of Agricultural Research* 1962;13(2):270-2.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (1995a). Frozen storage of ram semen. I: processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*, 37, 185-249.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (1995b). Frozen storage of ram semen. II: Causes of low fertility after cervical insemination and method of improvement. *Anim Reprod Sci*, 38, 1-36.
- Sanchez-Partida, L.G., Setchell, B.P., Maxwell, M.C. (1997). Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatazoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9- 689-696.
- Sansone, G., Natri, M.J.F., Fabbrocini, A. (2000). Storage of buffalo *Bubalus bubalis*/ semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 55–76.
- Schembri, M.A., Major, D.A., Suttie, J.J., Maxwell, W.M.C., Evans, G. (2002). Capacitation-like changes in equine spermatozoon throughout the cryopreservation process. *Reprod Fertil Dev*, 14, 225-233.
- Schöneck, C., Braun, J., Einspanier, R. (1996). Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*, 45, 633-642.
- Sevinç, A. (1984). Dölerme ve Suni Tohumlama. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları:397. Üçüncü baskı
- Sikka, S.C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Bioscience*, 1: 78-86.

- Sönmez, M. (2013).Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları.
- Steponkus, P.L., Dowgert, M.F., Gordon-Kamm, W.J. (1983). Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. *Cryobiology*, 20(4):448-465.
- Soylu, M.K. (1988). Çeşitli sulandırıcılar ve yöntemler kullanılarak dondurulan koç spermalarının bazı spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. İ Ü Sağlık Bilimleri Enst, Doktora Tezi, İstanbul.
- Söderquist, L., Lundeheim, N., Nilsson, B. (1999). Assessment of fertility after using different procedures to thaw ram spermatozoon frozen in mini straw. *Reprod Dom Anim*, 34, 61-66
- Sönmez, M. (2008). Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi İkinci basım.
- Tedder, R.S., Zuckerman, M.A., Brink, N.S., Goldstone, A.H., Fielding, A., Blair, S., Patterson, K.G., Hawkins, A.E., Gormon, A.M., Heptonstall, J., Irwin, M.B. (1995). Hepatitis-B transmission from contaminated cryopreservation tank. *The Lancet*.346(8968):137-140
- Tekin, N., Günzel, A.R. (1986). Koç spermasının değişik sulandırıcılarda dondurulması ve in vitro değerlendirme yöntemleri üzerine araştırmalar. *A Ü Vet Fak Derg*, 33(3), 380-392.
- Tombi, A.S.J. (2006). Koç spermasının dondurulmasında seminal plazma ve soğutma öncesi gliserol ilavesinin spermatolojik özelliklere etkisi
- Töpfer-Petersen, E., Cechová, D., Henschen, A., Steinberger, M., Friess, A.E., Zucker, A. (1990). Cell biology of acrosomal proteins. *Andrologia*, 22(1):110-121.
- Trimberger, W.C. (1974). Artificial Insemination. *Reproduction in Farm Animals* (Ed. E.S.E. Hafez). London, 145-174.
- Troedsson, M.H.T., Desvousges, A., Alghamdi, A.S., Dahms, B., Dow, C.A., Hayna, J et al. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci*, 89, 171-186.
- Tümen, H., Gökçen, H., Soyulu, M.K., Doğan, İ. (1991). Değişik düzeylerde vitamin -E katılarak sulandırılan koç spermasının spermatolojik özellikleri ve dölverimi üzerine araştırmalar. *U.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 10 (1-2-3): 91-98.
- Uçan, U. (2014). Fruktoz, trehaloz ve sükröz içeren tris bazlı sulandırıcıya kolesterol yüklü siklodekstrin (clc) ilavesinin koç spermasının dondurulabilirlik ve çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkilerinin araştırılması.

- Uysal, O., Bucak, M.N. (2007). Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen -thawed ram semen. *Açta. Vet. Brno*, 76: 383-390.
- Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Tempelman, R.J., Sprecher, D.J., Chou Karen. (2005). Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim Reprod Sci*, 87, 121132.
- Vicente, J.S., Viudes-De-Castro, M.P. (1996). A sucrose-dmsso extender for freezing rabbit semen. *Reproduction Nutrition Development*, 36(5):485-492.
- Wales, R.G., Choong, C.H. (1963). The effects of ultraviolet radiation on ram and bull spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, 16(4):885-895.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 7:871-891.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 7:871-891.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61:481-92
- White, I.G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*, 5, 639-658.
- Windsor, D.P., White, I.G., Voglmayr, J.K. (1988). Susceptibility to cold shock of spermatozoa from different regions of the ram epididymis. *Proc. Aust.Soc.Reprod.Biol.*20,109 (Abstr).
- Woods, E.J., Gilmore, J.A., Liu, J. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction*, 15(2):335-343.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. (ed). *The physiology of Reproduction*, Vol, 1, 2nd ed. New York, Raven Press, 189-317.
- Yudin, A.I., Generao, S.E, Tollner, T.L., Treece, C.A., Overstreet, J.W. Cherr, G.N. (2005). Beta.Defensin126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. *Biol Reprod*, 73(6), 1243-1252.



Yurdaydın, N. (1990). Spermının Alınması, Saklanması ve Sun'i Tohumlama. Ed. E.  
Alaçam Theriogenoloji Ders Kitabı. Ankara: Nuro! Matbaacılık. 77-90.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Salih NARLIÇAY  
Doğum Yeri ve Tarihi TOKAT-25/04/1990  
Medeni Hali Evli- 1 çocuk babası  
Yabancı Dil İngilizce  
İletişim Adresi Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Suni  
Tohumlama Bölümü, 58140-Sivas  
E-posta Adresi salihnarlicay@gmail.com

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise Tokat Atatürk Lisesi, 2007  
Lisans Ankara Üniversitesi, 2015  
Ünvan Veteriner Hekimi

### İş Tecrübesi

ERT Tar. ve Hay. İşl. Veteriner Hekimi, 2015-2015  
Tokat Vet. Sağ. Hiz. A.Ş Veteriner Hekimi, 2015-2016  
Yeşilırmak Et Komb. Veteriner Hekimi, 2016-