



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI**

**ALABALIK SEMİNAL PLAZMASININ KOÇ SPERMASININ SPERMATOLOJİK
ÖZELLİKLERİ VE VIABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Meral GÖKDAĞ

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2006



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

ALABALIK SEMİNAL PLAZMASININ KOÇ SPERMASININ SPERMATOLOJİK
ÖZELLİKLERİ VE VİABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Meral GÖKDAĞ

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SOYLU

Bursa-2006

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu tez, jürimiz tarafından
tezi olarak kabul edilmiştir.

Adı ve Soyadı İmza

Tez Danışmanı

.....

Üye

Üye

Üye

Üye

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih,
sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

.....
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TÜRKÇE ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	III
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ ve YÖNTEM.....	8
Gereç	8
Koç Spermı	8
Alabalık Seminal Plazması.....	8
Sulandırıcılar	8
Boyalar	9
Yöntem.....	10
Sperma Muayenesi.....	10
Çalışmanın Safhaları.....	11
İstatistik.....	12
BULGULAR	13
TARTIŞMA ve SONUÇ	37
EKLER.....	43
KAYNAKLAR.....	47
TEŞEKKÜR	52
ÖZGEÇMİŞ.....	53

ÖZET

ALABALIK SEMİNAL PLAZMASININ KOÇ SPERMASININ SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE VIABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Değişik oranlarda alabalık seminal plazması içeren koç sperması TRİS ile sulandırılarak 4⁰C'ta 72 saat süresince spermatozoon viabilitesi, motilite ve akrozom bütünlüğü yönünden incelendi. Pooling yapılan sperma TALP ile sulandırıldıktan sonra santrifüj yapılarak TALP ve koç seminal plazması ortamdaki uzaklaştırıldı. Kalan sperma 4 gruba bölündü. Birinci grup sperma miktarına göre oranlanan TRİS ile diğer 3 grup ise sperma miktarına göre %20, %40, %60 oranlarda alabalık seminal sıvısı ve ardında TRİS ile sulandırıldı. Sulandırma sonrası bütün gruplar 2 saatte +4°C'ye düşürüldü. Pooling, santrifüj ve sulandırma sonrası 4°C sonrasında ve 72. saatin sonuna kadar 12 saatte bir örnekler alındı. Bu örneklerde motilite, ölü spermatozoon ve akrozom bozuklukları oranına bakıldı. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmeleri için Statistica programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama ve standart hata (\pm SEM) değerleri olarak sunuldu ve ortalamaların güvenilirlikleri açısından t-Test uygulandı. Aynı zamanda fark analizi olan Confidence Interval Test uygulandı ve sonuçlar grafikler halinde sunuldu. Kontrol, %20, %40 ve %60 seminal sıvı ilaveli grupların arasındaki farklar için varyans analizi (ANOVA) uygulandı ve sonuçlar LSD ile test edildi. 10 tekrarlı yapılan çalışmanın sonucunda motilite değerlendirildiğinde 24. saate kadar kontrol, 24. saatten sonra %20 alabalık seminal plazmalı grup daha iyi sonuç verdi. Canlı spermatozoon oranı 24. saatten sonra %40 grubunda diğer gruplara göre daha iyi sonuçlar verdi. Akrozom yönünden %20 ve %40 alabalık seminal sıvısı içeren gruplarda diğer gruplara göre olumlu sonuçlar alındı. Alabalık seminal plazmasının farklı sulandırıcılarla ve farklı oranlar denenerek yeni çalışmaların yapılmasında ve bu çalışmaların *in vivo* ortamda dondurma ve fertilitate denemeleriyle desteklenmesinin yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelime: Koç, sulandırıcı, alabalık seminal plazması, spermatojistik özellikler

SUMMARY
THE EFFECT OF TROUT SEMINAL PLASMA TO RAM SPERMS
SPERMATOLOGICAL PROPERTIES AND VIABILITY

Ram sperm containing different ratios of trout seminal plasma and TRIS dilution preserved at 4°C was observed for 72 hours with reference to spermatozoon viability, motility, and achrosomatic stability. Pooled sperm was diluted with TALP; TALP and ram seminal plasma removed by centrifuge. Sperm so obtained was divided into 4 groups. Group 1 sperm were diluted by TRIS diluent at ratio determined by sperm quantity. The remaining three groups of sperm were diluted by trout seminal plasma at respectively 20%, 40%, and 60% and by TRIS as determined by sperm quantity. 2 hours upon dilution, all groups were reduced to +4°C. Samples were obtained respectively after pooling, centrifugation, and diluting, at 4°C and every 12 hours thereafter until the 72nd hour inclusive. Samples were examined regarding motility, spermatozoon death, achrosomatic stability. Final data was statistically evaluated by Statistica software. Results are presented in median and standard deviation (\pm SEM) values, t-test was implemented for median reliability. Confidence Interval Test was implemented for differential analysis and results presented graphically. ANOVA was implemented for identifying variance between control group and 20%, 40%, and 60% seminal plasma added groups. Results were tested by LSD (Least Significant Difference). Motility evaluation after the study had been repeated 10 times, indicated that while the control group yielded better result up to the 24th hour, the 20% trout seminal plasma added group yielded better result after the 24th hour. Spermatozoon death in the 40% group yielded comparatively better result after the 24th hour. In achrosomatic stability yielded better results in the 20% and 40% trout seminal plasma added groups. Further research is in order using trout seminal plasma with diluents in varying ratios, supported by freezing and fertility experiments in *in vivo* environment.

Key Words: Ram, diluent, trout seminal plasma, spermatological properties

GİRİŞ

Türkiye'nin coğrafi ve ekonomik koşulları nedeniyle tarım ve hayvancılık, halkın önemli geçim kaynaklarından olmuştur. Entansif ve ekstansif bakım kolaylıkları, et-süt-yapağı gibi çok yönlü verim özellikleri nedeniyle koyunculuk önem kazanmıştır.(1)

Hayvanlarda verim düzeylerinin artırılması için genotipik yapının ıslahı ile üstün verim özelliklerine sahip yeni nesillerin geliştirilmeleri ve devamlılıklarının sağlanması gerekir. Açıkça görüleceği üzere ıslah çalışmalarının üstün verim özelliklerine sahip erkek hayvanlarla yapılması gerekir ki burada doğal aşım yöntemini kullanmanın oldukça fazla zaman kaybettireceği ortadadır. Bu yüzden suni tohumlamanın ıslah çalışmalarındaki önemi büyüktür.

Koyunlarda suni tohumlama çalışmaları dünyada ilk kez 20.yy başlarında (1907-1912) Ivanov tarafından başlatılmış, I. Dünya Savaşından sonra Milavanov önderliğinde daha da ilerletilmiştir. Sovyetler Birliği'nde 1930'lu yıllarda koyun ıslah programlarında taze ve sulandırılmış sperma ile tohumlamalar yapılmıştır (2). Türkiye'de ise koyunlarda suni tohumlama ilk kez 1928'de uygulanmış, 1935'ten itibaren de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (1,3). 1948 yılında 4280 adet koyun tohumlanmış, 1968 yılında toplam 158 adet koyun suni tohumlama istasyonunun çalışmasıyla halk elinde tohumlanan koyunların sayısı 271.222'ye ulaşmıştır (1).

Mevsimsel poliöstrik olan koyunlarda, ekonomik koşullar nedeniyle senkronizasyon ve suni tohumlama çalışmaları yapılmaktadır. Suni tohumlama çalışmalarında amaç spermatozoonların daha uzun süre fertil olarak yaşatılmasıdır. Suni tohumlama genetik özellikleri iyi olan koçlardan maksimum faydalanma imkanı sunar. Koç spermasının uygun koşullarda sulandırılıp saklanması ile tatmin edici fertilite oranları sağlanır. Bu amaçla koç sperması kısa ve uzun süreli olarak saklanır. Koç spermasının saklanması için geliştirilen bütün metotlar sahada uygulamadan önce *in vitro* olarak denenmelidir (4,5). Koç spermasının saklanmasında sulandırıcılar ve oranları; saklama ısısı ve süreleri ile ilgili çalışmalarda hedef alınması gereken en önemli ve geçerli parametreler viabilite, motilite ve akrozom bütünlüğüdür (1,2,5-9) .

Koç sperması sulandırma ve soğutma işlemlerinde osmotik ve/veya soğuk şoklarına maruz kalarak potansiyel fertilitelerini önemli oranlarda kaybedebilirler. Günümüze değin çok sayıda araştırmacı değişik sulandırıcılar ve katkı maddeleri üzerinde çalışmışlardır. Son yıllarda farklı türlere ait seminal plazma ilavelerinin belirtilen olumsuz etkilere karşı hücreleri koruyabildikleri saptanmıştır (10). Ancak alabalık seminal plazması ve katkı

oranlarına ilişkin ayrıntılı bilgilere ulaşılamamıştır. Çalışmada değişik oranlarda alabalık seminal plazması içeren ko sperması hydroxymethylaminomethane (TRİS) sulandırıcısı ile sulandırılarak 4⁰C'ta 72 saat saklama süresince spermatozoon viabilitesi, motilite ve akrozom bütünlüğünün incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Koç spermasının hacmi, spermatozoon konsantrasyonu, motilitesi, normal spermatozoon oranı ve pH'sı sırasıyla 0.5-2.0 ml, $2-3 \times 10^9$ /ml., %60-%90, %80-%95, pH 5.9-7.3 arasında bildirilmiştir.(1,9,11-15)

Sperma seminal plazma ve spermatozoonlardan oluşur. Seminal plazmada epididimis, vas defferens, prostat, vesiculae seminalis ve cowper bezlerinin salgıları bulunur (9,15,16). Seminal plazma spermatozoonları genital sistemde taşır ve korur. Bu etki koç ve sığır gibi vajene ejakülasyon yapan türlerde, domuz ve at gibi servikse ejakülasyon yapan türlere göre daha önemlidir (15). Koç seminal plazmasında sitrik asit, ergothioneine, fruktoz, glyserol phosphoryl choline (GPC), sorbitol vardır. Bunların dışında az miktarlarda da askorbik asit, amino asitler, peptitler, proteinler, lipitler, yağ asitleri ve enzimler de bulunur (15). Seminal plazmanın antimikrobiyel bileşenleri seminal plazmin, immun globulunler ve bunların içinde de en önemlisi IgA'dır. Seminal plazmada androgenler, östrojen, prostaglandinler, FSH (Folikül Stimulan Hormon), LH (Lütein Hormon), koryonik gonodotropin benzeri maddeler, GH (growth hormon), insülin, prolaktin, rileksin ve tiroid releasing hormon gibi hormonlar bulunur (9,15). Seminal plazmanın biyokimyasal bileşimi, tür, ejakülasyon sıklığı, mevsim ve hayvanın sağlık durumuna göre değişkenlik gösterir (9).

Seminal plazma, spermatozoonların soğuk şokuna maruz kalma riskini azaltır (17), membran hasarlarını (16,18) ve soğutmanın indüklediği kapasitasyon benzeri olayları engeller (19,20,21). Seminal plazmanın yokluğunda ise kapasitasyon benzeri değişimler akrozom reaksiyonu ile sonuçlanır (20). Seminal plazma, koç ve boğa spermatozoonlarının motilitesini ve yaşama kabiliyetini artırır (22,23). Burada motiliteyi stimüle eden faktörler, seminal plazmadaki düşük molekül ağırlıklı fraksiyonlardır (24). Yanagimachi ve arkadaşları (25), ejakulasyonda sperma hücreleri ile seminal plazmanın temas ettiğini, seminal plazmadaki koruyucu faktörlerin spermatozoon yüzeyine bağlandığını ve bu faktörlerin hücreden uzaklaştırılmasına kadar erken kapasitasyon olaylarının önlendiğini bildirmişlerdir. Perez ve arkadaşları (17), kapasitasyonu önleyen bu faktörlerin bazı spermatozoonlarda daha az olduğunu ya da yüzeyden erken ayrılıp spermatozoonların kapasitasyona maruz kaldığını ifade etmişlerdir. Yudin ve arkadaşları (26), seminal plazmadaki Beta-defensin 126 (DEFB126) proteinin, kapasitasyon tamamlana kadar sperma hücrelerin yüzeylerini tamamen örttüğünü, kapasitasyon anında ya da kapasite olmuş spermatozoonlarda bu proteinin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla,

spermatozoonların immün sistem tarafından hemen tanınarak elimine edildiğini ifade etmişlerdir. Alghamdi ve Foster (27), seminal plazmadaki DNase enziminin, nötrofile ait DNA'ları sindirdiğini ve böylece daha fazla spermatozoonun ovidukta ulaşabildiğini bildirmişlerdir. Maxwell ve arkadaşları (19), 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 spermatozoonlarda oluşan olumsuzlukları önlediğini ve dolayısıyla yüksek fertilitte oranlarının elde edildiğini açıklamışlardır.

Alabalıkların üreme mevsimi su sıcaklığının 7-10°C olduğu ilkbahar aylarıdır. Alabalık spermasında miktar yoğunluk, pH sırasıyla 4-6 ml, 10-20x10⁶/ml, 7.0'dir Alabalık seminal plazmasında, Glukoz, T.lipid, T.Kolesterol, T.protein, inorganik P, Ca, Vit. C, Vit E, Vit A ve B Karoten sırasıyla %4.8 mg, %286 mg, %10 mg, %0.54 gr, %7.66 mg, 2.3 mg/dl, 3.43 mg/dl, 0.76 m, 3.56 mg/dl 4.28 mg/dl olarak bildirilmiştir (28). Alabalık seminal plazmasının bileşiminde Na, Cl, K, elementleri de vardır (29).

Spermatozoon baş, orta kısım ve kuyruktan oluşan özelleşmiş bir hücredir. Spermatozoonun son bölümünde spermatozoon hücre bölünmesi, büyüme, onarım ve biyosentez özelliklerini kaybetmiştir (30). Bu nedenle spermatozoonun uzun süre saklanması hedeflenen spermatozoonların metabolizmalarını azaltarak yaşam sürelerinin uzatılmasıdır. Taze spermaya göre sulandırılmış spermada spermatozoonların daha uzun süre yaşadıkları görülmüştür (31).

Koçtan alınan sperma sulandırılarak bir saat içinde kullanılabilmesi gibi, sulandırma sonrası 0⁰-15⁰C ısıya düşürülerek kısa süre ya da dondurularak uzun süre saklanabilir (32).

Günümüzde koç sperması alındıktan sonra sulandırılarak 5⁰C'de kısa veya dondurularak uzun süre saklanabilmektedir. Koçlardan alınan spermalar genel muayene ve kontrolleri yapıldıktan sonra uygun sulandırıcılarla sulandırılıp sıvı azot buharında dondurulur. Bu tekniğin dayandığı temel ilke uygun tekniklerle sperma ısısının -79⁰C ile -120⁰C'ye kadar düşürülerek sıvı azot içinde (-196⁰C) saklanmasıdır(33).

Spermanın dondurulma protokolünde bazı stres faktörleri vardır. Bu faktörler ısıdaki değişimler, kryoprotektanların molar konsantrasyonlarının neden olduğu ozmotik değişiklikler ve toksik maddelere bağlı stres ve hücre çevresinde oluşan buzlanmadır (2,34,35). Dondurma sırasında spermatozoonların karşılaştığı bu stres faktörlerine bağlı olarak hücre zarında oluşan değişiklikler kapasitasyonu olumsuz etkiler(36). Bu nedenlerden dolayı yapılan vajinal ve transservikal tohumlamalarda gebelik oranları düşük çıkar.

Sulandırıcıların görevleri:

- Spermayı hacim olarak artırmak.
- Spermatozoonların canlılığını daha uzun süre devam ettirmek.
- Spermatozoonları ani ısı değişikliklerine karşı korumak.
- Spermatozoonları bakterilere karşı korumak.
- Hücre zarı bütünlüğünün korunması.
- Hücre beslenmesinin devamının sağlanması.
- Hücrelerin etkinliklerini kaybetmemesinin ya da bu kayıpların en az düzeyde kalmasının sağlanmasıdır.(9,36,37)

Sulandırıcılarda bulunması gereken temel özellikler:

- .Ozmotik basıncın saklama süresince sabit olmalıdır
- Spermatozoonların metabolizmalarında bulunan mineral maddeleri içermelidir.
- Soğuk şokuna karşı spermayı koruyan kryoprotektif maddeleri içermelidir.
- Spermatozoonların metabolik artıklarını elemine etmelidir.
- Bakteriel kontaminasyonun kontrolü için antimikrobiel maddeleri içermelidir.
- Saklama süresince spermatozoonlara enerji sağlamalıdır (9,37,38).

Spermanın sulandırma miktarı daha çok tohumlama dozuna bağlıdır. Spermanın motilite, konsantrasyon ve hacmi arttıkça sulandırma miktarı da artar. (9,33,39,40). Bununla birlikte en uygun sulandırma oranlarının 1:4 ve 1:8 olduğu, 1:16 sulandırma oranında kötü sonuçlar alındığı bildirilmiştir (41). Ritar ve arkadaşları (42) teke ve koç spermasında yaptıkları bir araştırmada 1:2 oranında sulandırmanın 1:0.5 ve 1:1 oranında sulandırmaya göre üstün olduğunu bildirmişlerdir. Depolama sırasında sulandırma oranının yüksekliğine bağlı sperm inaktivasyonu spermatozoanın yaşlanmasına benzer etkiler yapar. Spermanın işlenmesi sırasında spermatozoayı korumak için deneysel temele bağlı sulandırıcılar düzenlenmiştir. Tris+sitrat+früktoz+yumurta sarısı da bunlardan biridir ve koçun da içinde olduğu çiftlik hayvanlarında sıklıkla kullanılır (40).

Sulandırma ile spermaya saklama süresince uygun ortam hazırlanır. Bunun yanında *in vivo* çalışmalarda sulandırmanın fazla olması durumunda total motilite, metabolik aktivite ve fertilizasyon kapasitesinde kalıcı kayıplar da olabilmektedir. Buna *Sulandırma Etkisi* denmektedir. Sulandırma etkisinin en az düzeyde kalması için sulandırıcının hazırlanması sırasında bazı tekniklere özen gösterilmelidir.

Spermanın sulandırılmasında dikkat edilecek özellikler:

- Sperma alındıktan kısa süre sonra sulandırılmalıdır.
- Sulandırıcıda ozmotik basıncı ayarlanmalıdır.
- Sulandırıcıda pH ayarlanmalıdır.
- Sulandırıcının ve kullanılan diğer malzemelerin ısısı 26-32°C olmalıdır.
- Kullanılan bütün laboratuvar malzemeleri temiz olmalıdır.
- Ozmotik basıncı değiştireceğinden ortama su karışmamalıdır.
- Ultraviyole ışınların etkisinden kaçınılmalıdır.

Bu sayılan özellikleri taşıyan ideal sulandırıcıların geliştirilmesi sürecinde; enerji kaynağı olarak glikoz gibi basit şekerler, sperma hücrelerini vücut ısısından 5°C'ye soğutulması sırasında soğuk şokuna karşı korumak için yumurta sarısı ve süt, pH'yı nötr ve ozmotik basıncı 300 mOsm'de tutmak üzere çeşitli tamponlar ve spermada bakteriyel gelişimi önlemek amacıyla penisilin, streptomisin gibi çeşitli antibiyotik kombinasyonları kullanılmıştır (15).

Sulandırma sırasında her zaman sulandırıcı spermaya karıştırılır ve sulandırma işleminin kısa sürede tamamlanması istenmez (9,15).

Spermatozoonun plazma membranı doymamış yağ asitlerinden zengindir. Bu yüzden de peroksidatif yıkımlanmaya uygun değildir (7). Spermatozoa normal fonksiyonu sırasında düşük oranda Reactive Oxygen Species (ROS) üretir. Fakat kalsiyum iyonoforları veya iyonomin gibi maddeler spermatozoonu uyarır ve ROS'da yıkımlanma olur. Spermatozoonun saklanması sırasında ROS'da yüksek oranda bozulma olursa bu kapasitasyon ve motilitede de azalmalara neden olur ki, bu durum sulandırıcılara antioksidanlar eklenerek önlenir (39).

Bu da sulandırma sırasında kullanılan antioksidan, şelat ajanları, aromatik bileşenler, organik maddeler gibi kullanılan sulandırıcıların spermatozoonların kapasitasyonları, hücrenin ve değişen hücre zarı yapısına etkilerine bağlıdır (36).

Koç spermasında spermatozoon membranındaki bozukluklar, spermaya 35-37°C'de yapılan işlemler, soğutulması sırasında maruz kaldığı soğuk şoku ve inkübasyonu sırasında yaşlanmasından kaynaklanmaktadır (4). Koç spermasında taze spermaya göre soğutulmuş olarak saklanan spermada fertilitenin düşmesine neden olan morfolojik bozulma ve motilite azalması görülmektedir (4,7,43,44). Ancak bu bozulmalar sulandırılan ve soğutulan

spermada dondurulup çözdürülen spermaya göre çok daha azdır (4,30,43,45). Bu nedenle bu konuyla ilgili daha başka çalışmaların yapılmasına da gereksinim vardır.

Maxwell ve Watson (7), motil hücre sayısı azaldığında fertilizasyonun da düştüğünü bunun, sperma kalitesi yönünden olumsuzluk işareti olduğunu ve ölü spermatozoon oranının %25'in üzerine çıkmasının istenmeyen bir özellik olduğunu belirtmiştir .

Özkoca'da (10) spermada bulunan anormal spermatozoon oranı ile döl verimi arasında sıkı bir ilişki olduğunu bildirmiştir Kimi yazarlara (11,46) göre ise anormal spermatozoon oranı ile anormal spermatozoonların tipleri de döl verimi üzerine olan etkilerinden dolayı ayrı ayrı önem taşımaktadırlar. Morfolojik olarak %5-10 arasında anormal spermatozoon oranı normal kabul edilirken, bu oranın %25'ten, anormal başlı spermatozoon oranının da %1'den yüksek olduğu durumlarda fertilitenin şüpheli olduğu bildirilmiştir (7,11).

Stojonov ve arkadaşlarının (7) *in vitro* mature oositlerin *in vitro* fertilizasyonu ile yaptıkları çalışma, koç spermasının fertilizasyon kapasitesinin Tris-Sitrat sulandırıcısında +5°C'de 14 güne kadar sürdüğünü göstermiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇ

Koç Spermaları

Çalışmanın materyalini Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı Hayvansal Üretim ve Uygulama Merkezi Koyunculuk Ünitesi'nde aynı bakım ve besleme şartlarına sahip 3 baş İvesi ırkı koçtan suni vajen yöntemiyle alınan sperma örnekleri oluşturmuştur (33,34,43,47-51). Sperma örnekleri pooling yapılarak çalışılmıştır. Bu örnekleme 10 tekrar olarak yapılmıştır.

Alabalık Seminal Plazması

Araştırmada kullanılan alabalık seminal plazması ise alabalıkların üremesi için gerekli olan su sıcaklığının 7°C-10°C olduğu şubat ayında Ege Üniversitesi Tire Meslek Yüksek Okulu'nun Tire'de bulunan Eğitim ve Uygulama Çiftliği'ndeki yetişkin alabalıklardan sağım yöntemi ile alındı (38). Buz kutularında sağlanan +4°C'lik taşıma koşullarıyla laboratuvara getirilen alabalık spermaları 3000 rpm 'de 5 dakika santrifüj edilerek seminal plazmasından ayrıldı. Elde edilen alabalık seminal plazması 1 cc'lik eppendorf tüplere alınarak kullanılacağı zamana kadar -18°C'lik derin dondurucularda saklandı.

Sulandırıcılar

Ana sulandırıcı olarak ve kontrol grubunda kullanılan TRİS sulandırıcısı içerisinde yumurta sarısı da bulunduğundan, herhangi bir mikrobiyolojik üreme yapmaması bakımından, her bir çalışma grubu için bir gece öncesinden taze olarak hazırlandı ve +4°C'de saklandı. (Tablo 1)

Tablo-1 TRİS sulandırıcısının hazırlanması (10)

Kullanılan Malzeme	Kullanılan Miktar
Tris (Merck 1.10695.0250)	3,6g
Sitrik asit (Sigma C-2404)	1,9g
Früktoz (Sigma F-3510)	0,5g
Yumurta sarısı	15ml
Penisilin G (Sigma P-3032)	1000 IU/ml
Deionize bidistile su	qsp 100 ml

Her bir çalışmada ihtiyaç kadar kullanılacak olan Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate

(TALP) solüsyonu tablo-7’de belirtildiği şekilde hazırlandı ve +4°C’de saklandı.

Tablo-2 TALP solüsyonunun hazırlanması: (10)

A)Stok Solüsyonun Hazırlanması

Kullanılan malzemeler	Malzeme Miktarları
NaCl (Sigma S-5886)	3,275 g
KCl (Sigma P-5405)	0,150 g
CaCl.2H ₂ O (Sigma C-7902)	0,165 g
MgCl.6H ₂ O (Sigma M-2393)	0,053 g
NaH ₂ HPO ₄ . H ₂ O (Sigma S-9638)	0,057 g
De-ionize bidistile su	Qsp 500 ml

B) Solüsyonun Hazırlanması

Kullanılan Malzemeler	Malzeme Miktarları
Na-Bikarbonat (Sigma S-5761)	8,0 mg
Glikoz (Sigma G-6152)	45,0 mg
Na-Privat (Sigma P-4562)	5,6 mg
HEPES (Sigma H-6147)	119,0 mg
Laktik asit (%60) (Sigma L-4263)	185,0 µl
BSA (Sigma A-4378)	300 mg
Stok Solüsyon	50 ml

pH 7,4 E ayarlandı

Boyalar

Eozin-Nigrozin (Sigma E-258-3, Sigma N-4763) ana solüsyonu %1 Eozin ve %8 Nigrozin içerecek ve pH 9.4-9.6 olacak şekilde hazırlandı.

Giemza (Sigma GS-500) boya 5 ml distile suya 10 damla oranında May Grünwald Giemza ana solüsyonu karıştırılarak hazırlandı.

YÖNTEM

Sperma muayenesi

Pooling yapılan sperma, hacim, renk, pH, kitle hareketi, motilite, yoğunluk, ölü-canlı oranı ve akrozom defektli spermatozoon oranı yönünden incelendi.

Spermanın hacmi dereceli toplama kadehinde ml cinsinden okundu. (8,9)

Spermada krem-beyaz renk normal kabul edildi. Sperma içinde irin ya da kan bulunup bulunmadığı kontrol edildi (1,9).

Spermanın pH'sı 0-14 skalalı pH indikatör kağıdının (Merck 9557)ejekülata daldırılarak okunmasıyla bakıldı.

Spermada kitle hareketi muayenesi ısıtıcı tablalı faz kontrast mikroskopta, lam üzerine taze sperma damlatıldıktan sonra X10 büyütmede yapıldı. + ile ++++ arasında değerlendirildi (9).

Bireysel hareketi saptamak için sperma, aynı ısı derecesine getirilmiş %0,9'luk NaCl ile ısıtılmış lam üzerinde 1:1 oranında sulandırılarak lamelle kapatıldıktan sonra ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta X40 büyütmede üç farklı sahada incelendi. Tek yönde ve ileriye doğru güçlü hareket edenlerin oranı spermatozoonun % motilitesi olarak kaydedildi (8,9).

Çalışmada yoğunluk saptanması hemositometrik yöntemle yapıldı (1,9,13,52). Buna göre eritrosit pipetinin 0,5 çizgisine kadar taze sperma çekildi, pipetin ucu temizlendikten sonra 101 çizgisine kadar %3'lük NaCl solüsyonu eklendi. Böylece sperma 200 katı sulandırılmış oldu. Yatay durumda birkaç dakika süreyle çalkalanan pipetten ilk birkaç damla atıldıktan sonra Thoma lamında lam-lamel arasına sulandırılmış sperma akıtılıp tam olarak dağılma ve hücre çökmesi için birkaç dakika beklendikten sonra, X40 büyütmede sayım yapıldı. Sayım sırasında Thoma lamındaki büyük karelerden herhangi 5 tanesi değerlendirmeye alındı. Sayım sonrası hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\text{Yoğunluk (/mm}^3\text{)} = \frac{\text{Sayılan spermatozoon sayısı}}{\text{Sayılan toplam küçük kare sayısı} \times \text{bir küçük karenin hacmi} \times \text{sulandırma oranı}}$$

Ölü spermatozoonların sayımı için Eozin-Nigrozin boyama yapıldı (9). İmmersiyon objektifte 333 adet spermatozoon sayıldı. Bozulan hücre yapılarından dolayı boya

aldıklarından boya alan spermatozoonlar ölü spermatozoon olarak kabul edildi. Daha sonra elde edilen sayılar 3 ile çarpılıp 10'a bölünerek ölü spermatozoonların % oranları bulundu.

Akrozom defektli spermatozoonların sayımı için %0.9 NaCl ile 1:1 oranında lam üzerinde karıştırılan sperma ile frotiler hazırlandı. Kurutulan frotiler 10 dakika metanolde tespit edildikten sonra Giemza boyama yapıldı (9). İmmersiyon objektifte 333 adet spermatozoon sayıldı. Bunların içinde akrozom defektli spermatozoonların sayısı belirlendi. Elde edilen akrozom defektli spermatozoonların sayısı 3 ile çarpılıp 10'a bölünerek akrozom defektli spermatozoonların % oranları bulundu.

Çalışmanın Safhaları:

İçinde %0,9 izotonik NaCl, Eosin-Nigrosin boya, TALP, TRİS ve alabalık seminal sıvısı olan tüpler çalışma sırasında sperma ile aynı ısıda olmaları açısından 35-37°C'lik su banyosunda tutuldular. Kullanılacak olan cam malzemeler 35°C'lik etüvde bekletildi.

Her bir koçtan usulüne uygun olarak suni vajenle alınan ejakülat örnekleri 35-37°C'lik su banyosunda yolda ışık görmeyecek şekilde üzerleri örtülerek laboratuara götürüldüler (9,31).

Laboratuarda pooling yapılan ejakülatlarda kitle hareketi +++ ve üzeri, motilite %80 ve üzeri, yoğunluk 2.5×10^9 /ml ve üzeri kriterleri dikkate alınarak muayeneler yapıldı (42,44,47). Kriterlerin sağlandığı görüldükten sonra pooling sonrası ilk örnekler alınarak çalışma başlatıldı. (Tablo 3)

Pooling yapılan sperma 1:3 oranında TALP ile sulandırıldıktan sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildiğinde spermatozoonların TALP ve seminal sıvıdan ayrılmadıklarına kanaat getirildiğinden 1500 rpm'de 2,5 dakika olarak santrifüj edildi (48).

Santrifüj sonrasında sperma üzerine eklenen TALP solüsyonunun tamamı mikro pipet yardımıyla alındıktan sonra alınabilen kadar (gruplar arasında sabitlik yok) koç sperma seminal sıvısı da alındı. Kalan spermada motilite, ölü-canlı oranı ve akrozom defekti oranının saptanması için muayeneler yapıldı.

Elde edilen sperma örnekleri hacim olarak eşit 4 gruba bölündü.

1-Kontrol grubu: 1 hacim sperma 3 hacim TRİS solüsyonu ile sulandırılarak kontrol grubu oluşturuldu.

2-%20 SP grubu: 1 hacim sperma, spermanın hacimce %20'si kadar alabalık seminal sıvısı ile karıştırıldı ve toplam hacmi kontrol grubuyla eşit olacak şekilde TRİS ile tamamlandı.

3-%40 SP grubu: 1 hacim sperma, spermanın hacimce %40'ı kadar alabalık seminal sıvısı ile karıştırıldı ve toplam hacmi kontrol grubuyla eşit olacak şekilde TRİS ile tamamlandı.

4-%60 SP grubu: 1 hacim sperma, spermanın hacimce %60'ı kadar alabalık seminal sıvısı ile karıştırıldı ve toplam hacmi kontrol grubuyla eşit olacak şekilde TRİS ile tamamlandı.

Böylece sperma miktarları aynı, toplam hacimleri aynı, alabalık seminal sıvısı miktarları spermaya göre oranlanan ve buna göre TRİS miktarları farklı 4 grup oluştu.

Her grupta ayrı ayrı motilite, ölü-canlı oranını ve akrozom defekti oranının saptanması için muayeneler yapıldı.

Bu ana kadar 35°-37°C'lik su banyosunda tutulan örnekler su banyosu ile birlikte 22°-24°C'lik ikinci bir su banyosuna koyularak +4°C'lik buzdolabına alındı. Dıştaki su banyosuna buz parçaları atılarak spermaların ısılarının 2 saatte +4°C'ye düşürülmesi sağlandı (53). Örneklerin +4°C'ye düşürüldüğü zaman 0. saat olarak kabul edildi ve 12 saat aralıklarla olmak üzere 72. saat sonuna kadar 7 kez daha motilite, ölü-canlı oranı ve akrozom defekti oranının saptanması için muayeneler yapıldı.

İstatistik

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmeleri için Statistica (StatSoft.Inc. Ver.6.0) programı kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ve standart hata (\pm SEM) değerleri olarak sunulmuş ve ortalamaların güvenilirlikleri açısından t-Test uygulanmıştır. Aynı zamanda fark analizi olan Confidence Interval test uygulanmış ve sonuçlar grafikler halinde sunulmuştur. Diğer taraftan kontrol, %20, %40 ve %60 seminal sıvı ilaveli grupların arasındaki farklar için varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve sonuçlar LSD (Least Significant Diffirence) ile test edilmiştir. Tüm sonuçların önem seviyelerinde $p<0.05$ için (*), $p<0.01$ için (**), $p<0.001$ için (***) kullanılmıştır.

BULGULAR

Alabalık seminal sıvısının +4⁰ C de saklanan koç spermasının viabilitesi üzerine zamana bağılı etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada pooling yapılmış koç spermasında pH 6.4-6.8, kitle hareketi +++, yoğunluk 2.5x10⁹-4.8x10⁹ olarak bulundu.

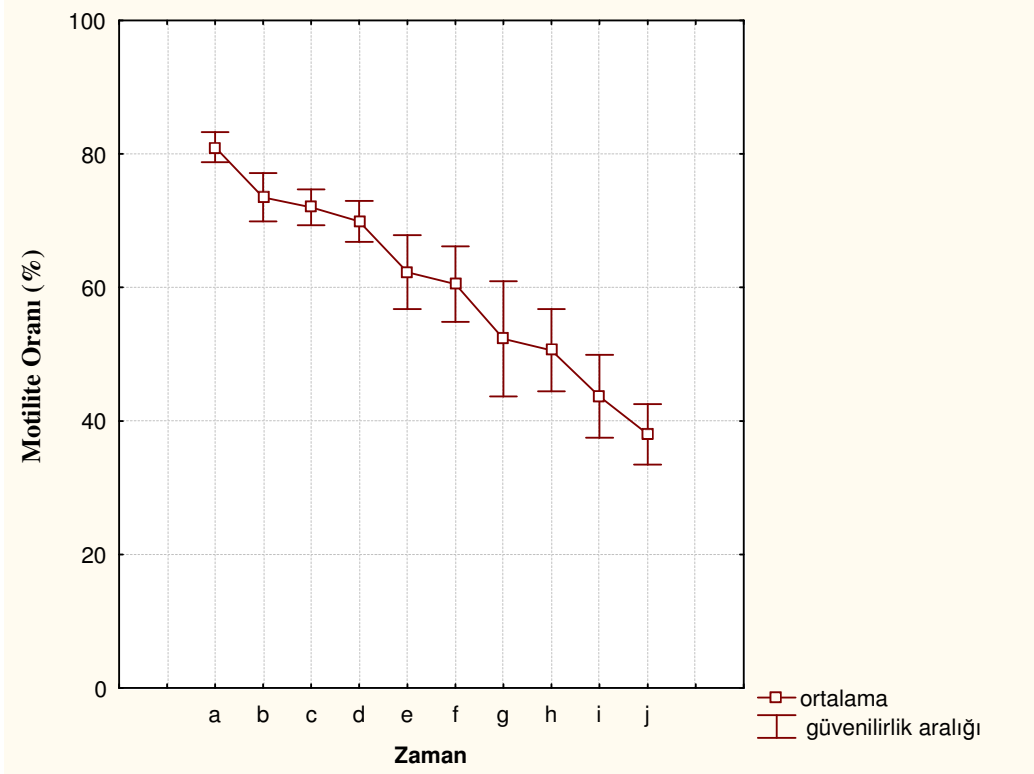
Tablo-3 Pooling yapılmış spermaların özellikleri

n	pH	Kitle Hareketi	Yoğunluk	Motilite %
1	6.8	++++	3.8x10 ⁹	80
2	6.4	++++	4.8x10 ⁹	80
3	6.4	++++	4.2x10 ⁹	80
4	6.4	++++	2.97x10 ⁹	80
5	6.4	++++	3.62x10 ⁹	85
6	6.4	++++	2.62x10 ⁹	80
7	6.5	++++	3.14x10 ⁹	85
8	6.4	++++	3.54x10 ⁹	80
9	6.4	++++	2.5x10 ⁹	80
10	6.7	++++	4.27x 10 ⁹	85

Tablo-4 Kontrol ve deneme gruplarında motilite ortalaması(%), standart hata (\pm (SEM) ve güvenilirlik sonuçları

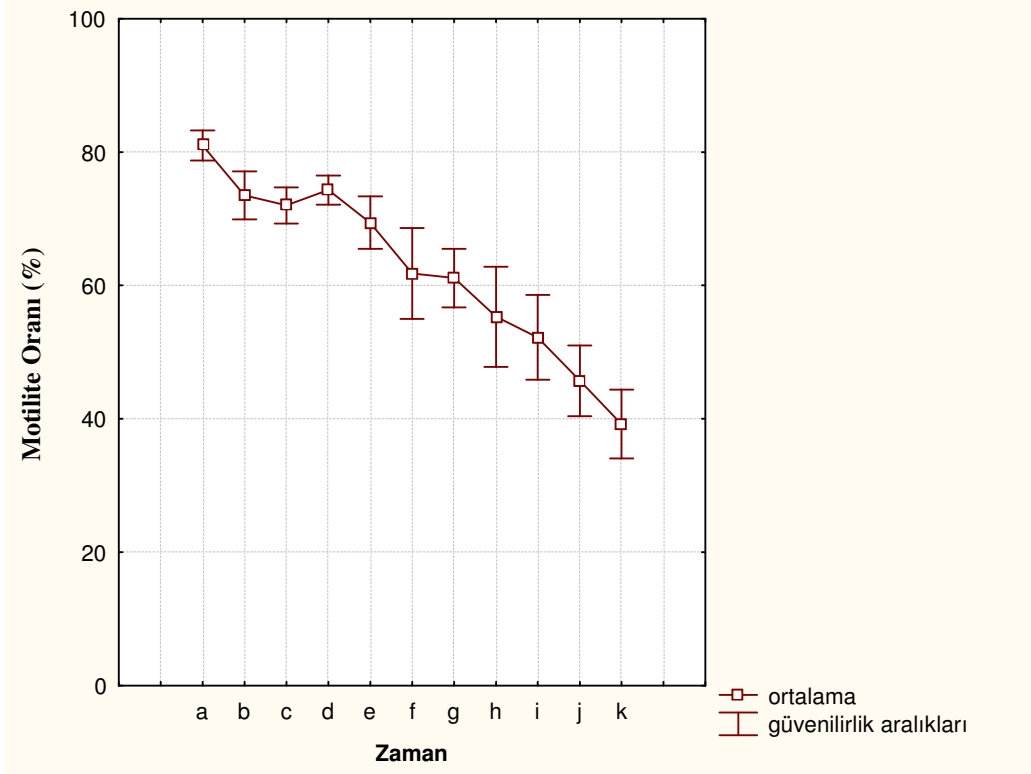
	n	MOTİLİTE % \pm (SEM)	t-Test
Pooling	10	81.00 \pm 1.00	81.00***
Santrfüj sonrası	10	73.50 \pm 1.60	45.92***
Sulandırma sonrası			
kontrol	10	72.00 \pm 1.19	60.37***
% 20 SP	10	74.30 \pm 0.96	76.86***
% 40 SP	10	73.80 \pm 1.56	47.24***
% 60 SP	10	73.90 \pm 1.26	58.64***
0.Saat (Başlangıç)			
kontrol	10	69.90 \pm 1.35	51.64***
% 20 SP	10	69.40 \pm 1.73	39.89***
% 40 SP	10	68.50 \pm 2.04	33.49***
% 60 SP	10	67.20 \pm 2.23	30.13***
12. Saat			
kontrol	10	62.30 \pm 2.44	25.52***
% 20 SP	10	61.80 \pm 3.00	20.57***
% 40 SP	10	57.10 \pm 2.20	25.85***
% 60 SP	10	60.30 \pm 2.44	24.66***
24. Saat			
kontrol	10	60.50 \pm 2.49	24.24***
% 20 SP	10	61.10 \pm 1.92	31.67***
% 40 SP	10	58.70 \pm 2.26	25.96***
% 60 SP	10	60.50 \pm 2.08	29.04***
36. Saat			
kontrol	10	52.30 \pm 3.82	13.67***
% 20 SP	10	55.30 \pm 3.31	16.68***
% 40 SP	10	51.90 \pm 4.19	12.36***
% 60 SP	10	49.60 \pm 4.14	11.96***
48. Saat			
kontrol	10	50.60 \pm 2.71	18.62***
% 20 SP	10	52.20 \pm 2.81	18.56***
% 40 SP	10	51.60 \pm 3.19	16.17***
% 60 SP	10	52.10 \pm 3.40	15.30***
60. Saat			
kontrol	10	43.70 \pm 2.75	15.87***
% 20 SP	10	45.70 \pm 2.34	19.50***
% 40 SP	10	46.10 \pm 3.04	15.11***
% 60 SP	10	44.80 \pm 2.66	16.80***
72. Saat			
kontrol	10	38.00 \pm 2.00	19.00***
% 20 SP	10	39.20 \pm 2.27	17.19***
% 40 SP	10	38.80 \pm 2.35	16.46***
% 60 SP	10	37.20 \pm 2.64	14.04***

(*** p<0.001).



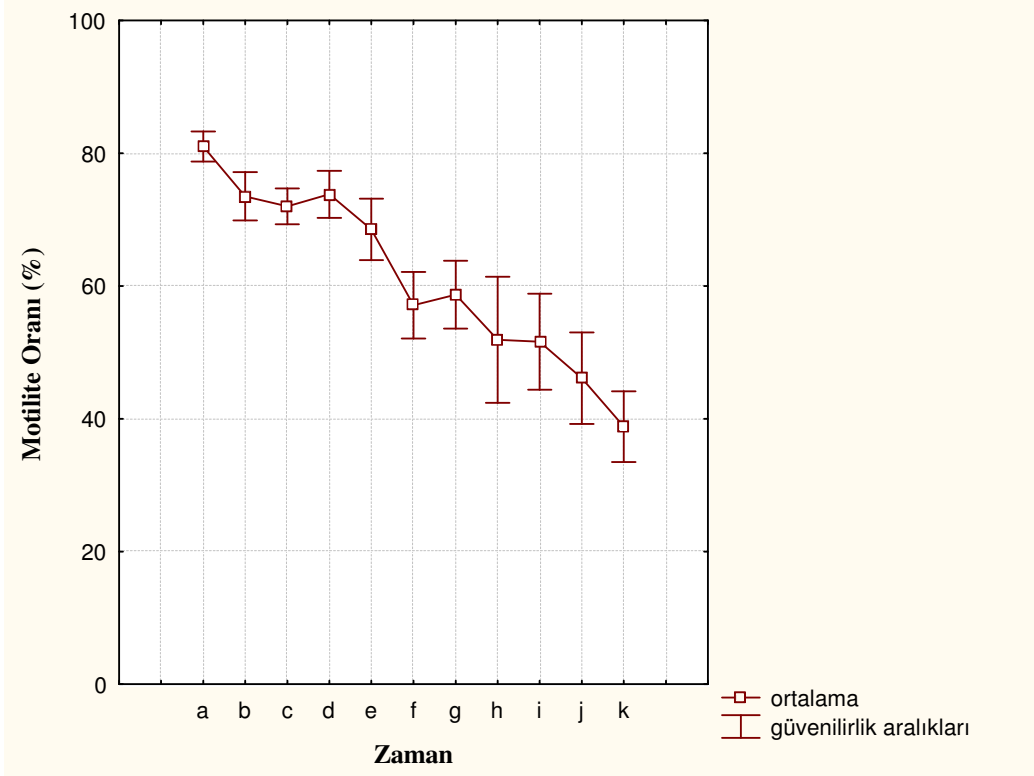
a:pooling, b:santrfüj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: 0. saat, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72. saat

Şekil-1 Kontrol grubunda motilitenin zamana bağlı değişimi ($p < 0.05$)



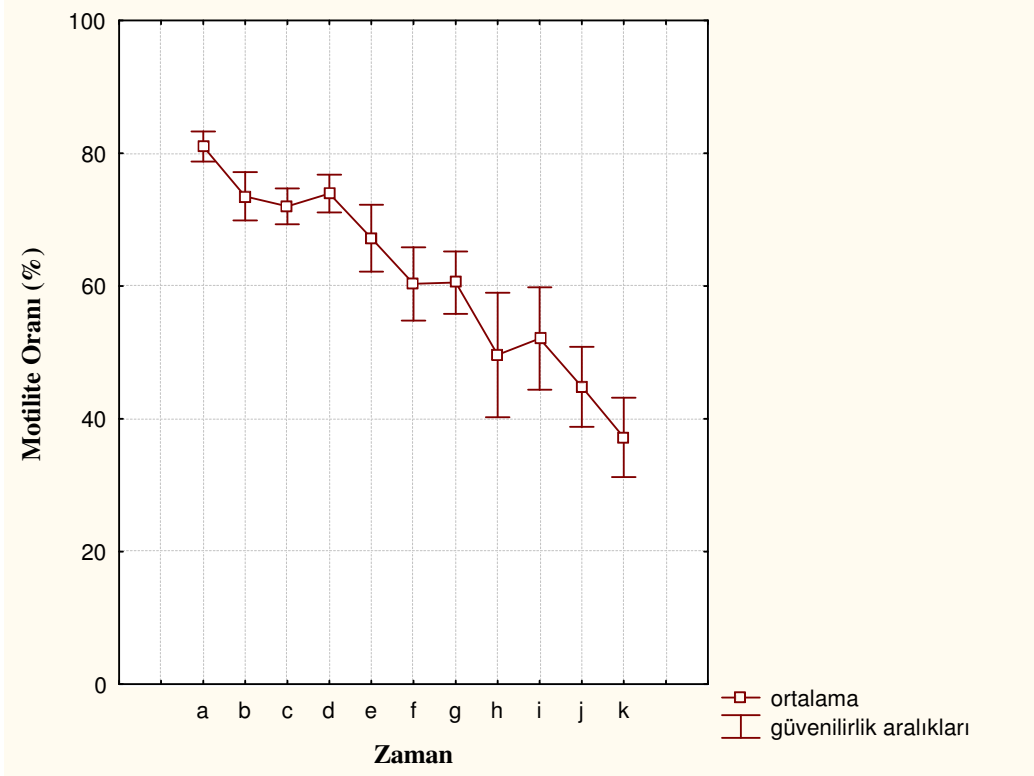
a:pooling, b:santrfuj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: 0. saat, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.saat

Şekil-2 %20 SP grubunda motilitenin zamana bağlı değişimi ($p < 0.05$).



a:pooling, b:santrfüj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: 0.saat, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.saat

Şekil-3 %40 SP grubunda motilitenin zamana bağlı değişimi (p<0.05).



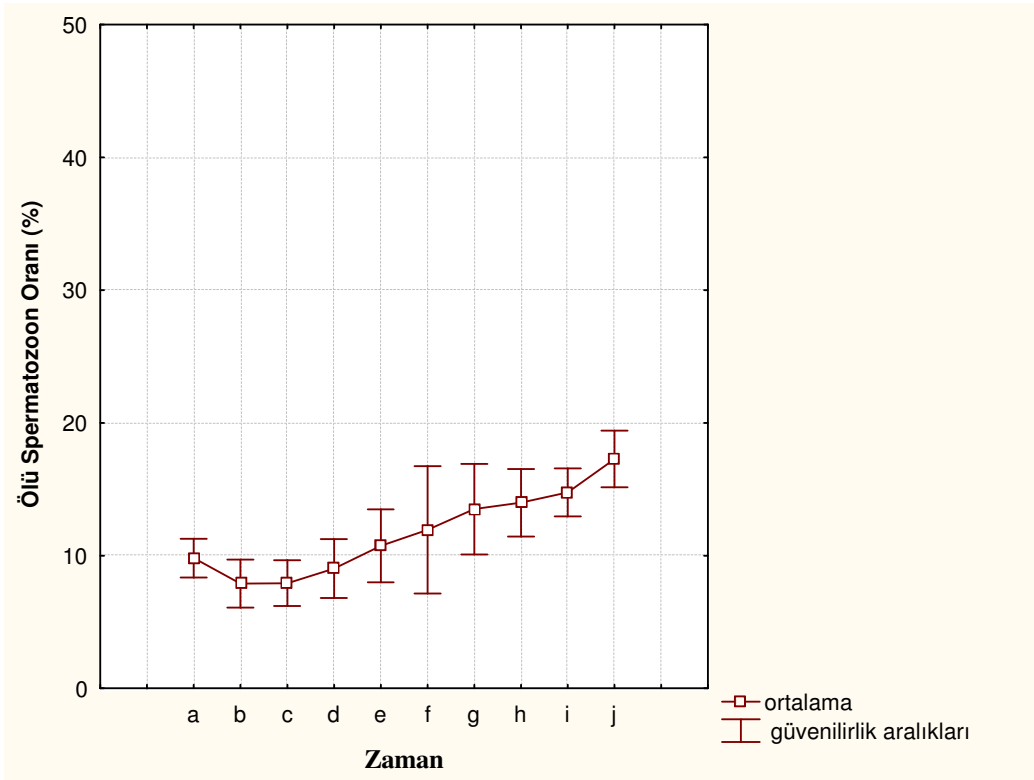
a:pooling, b:santrifüj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: 0.saat , e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.saat

Şekil-4 %60 SP grubunda motilitenin zamana bağlı değişimi ($p < 0.05$).

Tablo-5 Kontrol ve deneme gruplarında ölü/canlı spermatozoon ortalaması(%), standart hata (\pm (SEM) ve güvenilirlik sonuçları

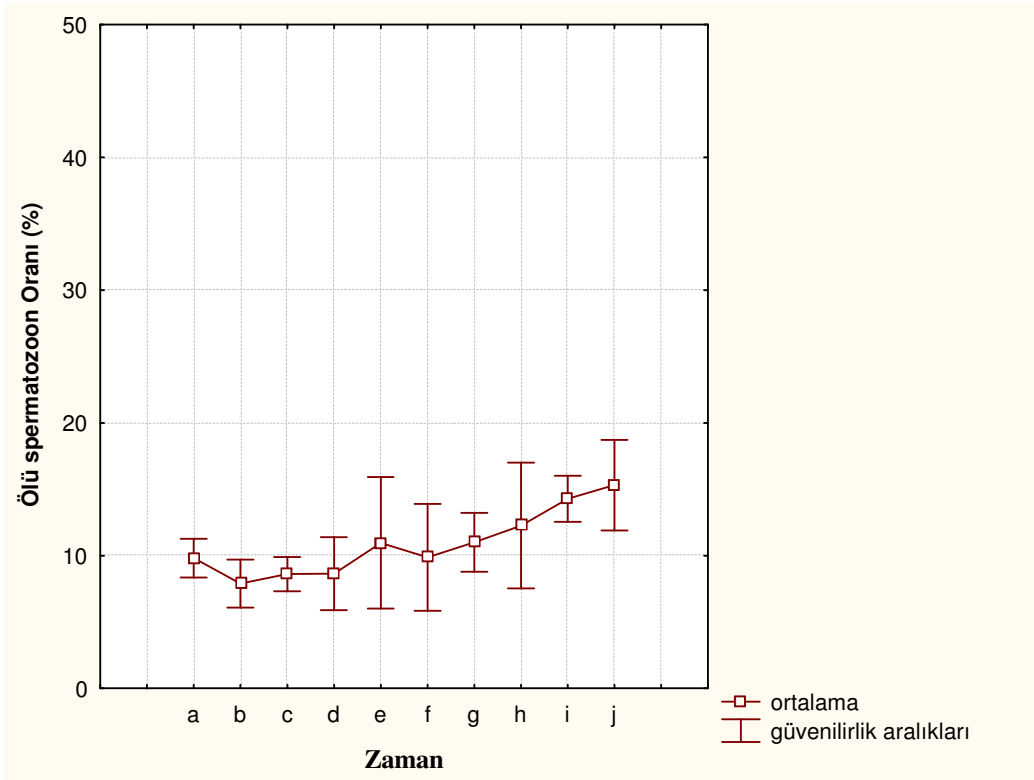
	n	ÖLÜ-CANLI(%) \pm (SEM)	t-test
Pooling sonrası	10	9.81 \pm 0.64	15.17***
Santrfüj sonrası	10	7.89 \pm 0.80	09.86***
Sulandırma sonrası			
kontrol	10	07.92 \pm 0.76	10.39***
% 20SP	10	08.61 \pm 0.57	14.98***
% 40 SP	10	10.50 \pm 0.88	11.91***
% 60 SP	10	09.60 \pm 1.27	07.55***
0. saat (Başlangıç)			
kontrol	10	09.03 \pm 0.97	09.25***
% 20 SP	10	08.64 \pm 1.21	07.12***
% 40 SP	10	10.17 \pm 1.83	05.54***
% 60 SP	10	10.80 \pm 1.68	06.42***
12. Saat			
kontrol	10	10.74 \pm 1.21	08.83***
% 20 SP	10	10.96 \pm 2.19	05.00***
% 40 SP	10	10.17 \pm 1.81	05.61***
% 60 SP	10	06.60 \pm 1.06	06.17***
24. Saat			
kontrol	10	11.94 \pm 2.11	05.64***
% 20 SP	10	09.87 \pm 1.77	05.55***
% 40 SP	10	08.34 \pm 1.68	04.95***
% 60 SP	10	12.90 \pm 1.48	08.66***
36. Saat			
kontrol	10	13.50 \pm 1.51	08.93***
% 20 SP	10	11.01 \pm 0.98	11.21***
% 40 SP	10	10.32 \pm 1.10	09.34***
% 60 SP	10	12.57 \pm 1.47	08.54***
48. Saat			
kontrol	10	13.98 \pm 1.12	12.47***
% 20 SP	10	12.27 \pm 2.09	05.85***
% 40 SP	10	11.94 \pm 1.69	07.04***
% 60 SP	10	12.90 \pm 1.08	11.92***
60. Saat			
kontrol	10	14.76 \pm 0.79	18.58***
% 20 SP	10	14.28 \pm 0.76	18.69***
% 40 SP	10	13.59 \pm 1.86	07.27***
% 60 SP	10	14.85 \pm 1.46	10.15***
72. Saat			
kontrol	10	17.28 \pm 0.94	18.31***
% 20 SP	10	15.30 \pm 1.50	10.15***
% 40 SP	10	15.93 \pm 2.51	06.34***
% 60 SP	10	16.89 \pm 1.24	13.60***

(*** p<0.001).



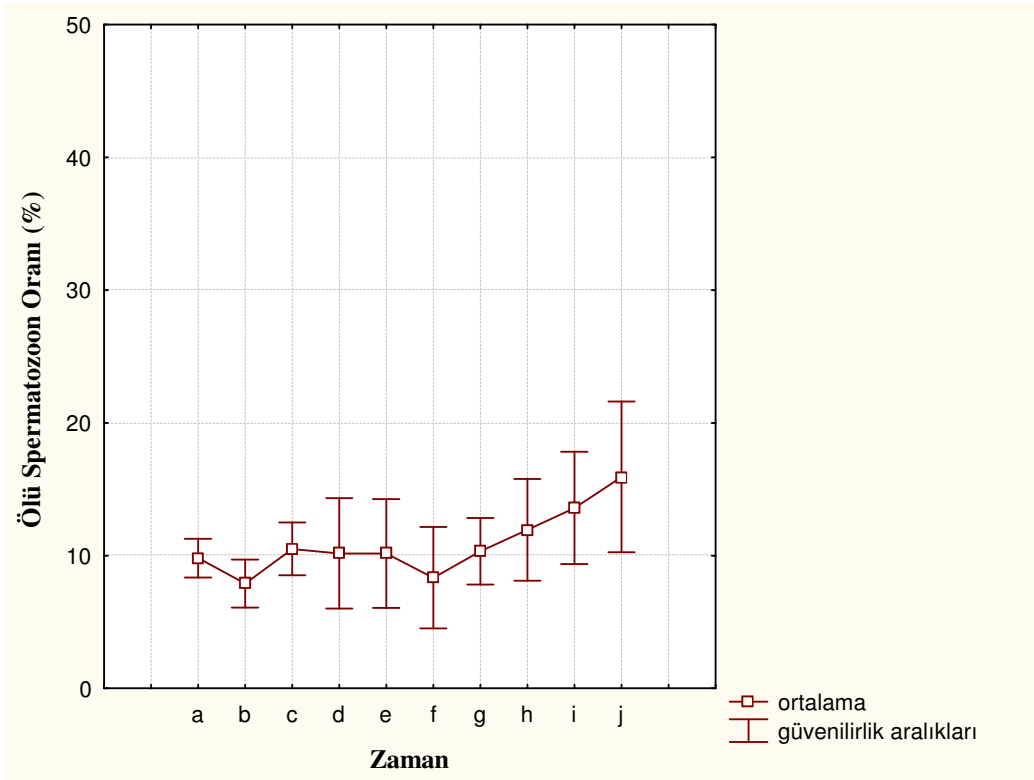
a:pooling, b:santrfüj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: 0. saat, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.saat

Şekil -5 Kontrol grubunda ölü spermatozoon oranının zamana bağlı değişimi ($p>0.05$)



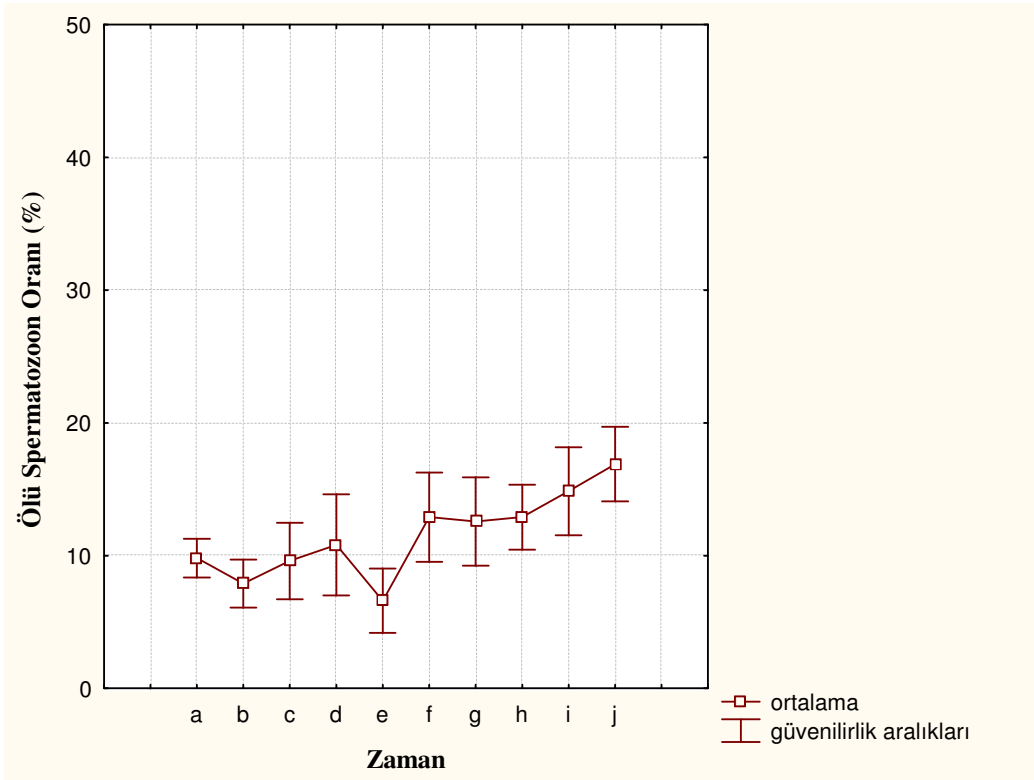
a:pooling, b:santrfüj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: 0. saat, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.saat

Şekil-6 %20 SP grubunda ölü spermatozoon oranının zamana bağlı değişimi (p<0.05).



a:pooling, b:santrfüj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: 0. saat, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.saat

Şekil-7 %40 SP grubunda ölü spermatozoon oranının zamana bağlı değişimi (p<0.05).



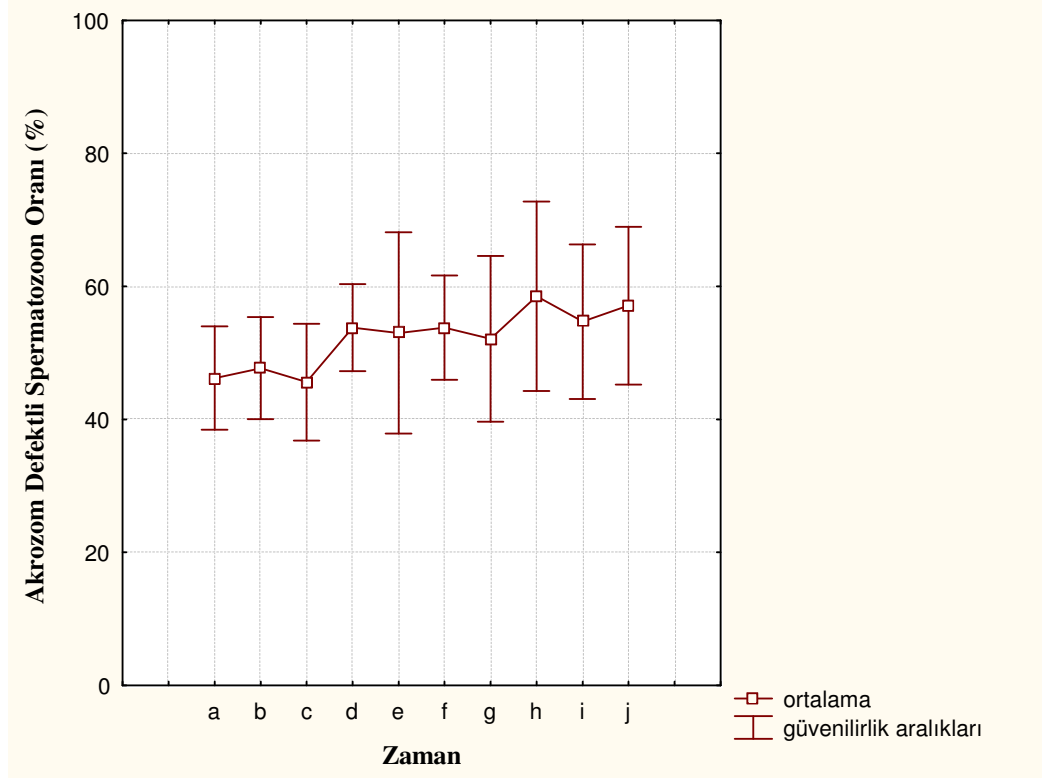
a:pooling, b:santrfüj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: o. saat, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.saat

Şekil-8 %60 SP grubunda ölü spermatozoon oranının zamana bağlı değişimi (p<0.05).

Tablo-6 Kontrol ve deneme gruplarında akrozom defektli spermatozoonların ortalaması(%), standart hata (\pm (SEM) ve güvenilirlik sonuçları

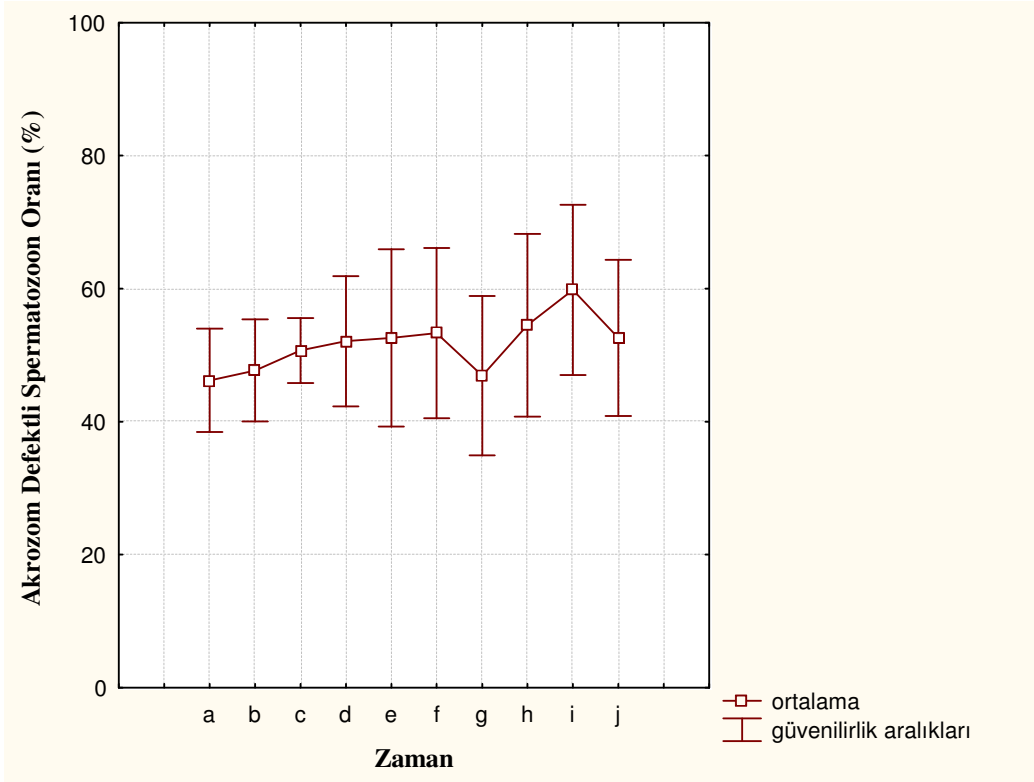
	n	AKROZOM (%) \pm (SEM)	t-Test
Pooling	10	46.20 \pm 3.43	13.43***
Santrfuj sonrası	10	47.70 \pm 3.39	14.05***
Sulandırma sonrası			
kontrol	10	45.60 \pm 3.87	11.76***
% 20 SP	10	50.70 \pm 2.16	23.46***
% 40 SP	10	51.60 \pm 4.54	11.34***
% 60 SP	10	54.20 \pm 4.81	11.25***
0. saat (Başlangıç)			
kontrol	10	53.80 \pm 2.98	18.61***
% 20 SP	10	52.10 \pm 4.32	12.04***
% 40v SP	10	55.50 \pm 4.77	11.64***
% 60 SP	10	58.70 \pm 4.37	13.41***
12. Saat			
kontrol	10	53.00 \pm 6.68	07.93***
% 20 SP	10	52.60 \pm 5.89	08.92***
% 40 SP	10	53.80 \pm 3.98	13.50***
% 60 SP	10	59.50 \pm 3.90	13.50***
24. Saat			
kontrol	10	53.80 \pm 3.47	15.49***
% 20 SP	10	53.30 \pm 5.66	09.41***
% 40 SP	10	52.40 \pm 4.76	10.98***
% 60 SP	10	55.90 \pm 6.31	08.84***
36. Saat			
kontrol	10	52.10 \pm 5.50	09.46***
% 20 SP	10	46.90 \pm 5.29	08.85***
% 40 SP	10	51.00 \pm 5.15	09.89***
% 60 SP	10	51.20 \pm 4.85	10.54***
48. Saat			
kontrol	10	58.50 \pm 6.29	09.29***
% 20 SP	10	54.50 \pm 6.06	08.98***
% 40 SP	10	53.70 \pm 4.45	12.04***
% 60 SP	10	57.90 \pm 5.72	10.11***
60. Saat			
kontrol	10	54.70 \pm 5.14	10.64***
% 20 SP	10	59.80 \pm 5.65	10.57***
% 40 SP	10	64.40 \pm 5.69	11.30***
% 60 SP	10	61.90 \pm 4.35	14.22***
72. Saat			
kontrol	10	57.10 \pm 5.23	10.89***
% 20 SP	10	52.60 \pm 5.19	10.43***
% 40 SP	10	56.60 \pm 5.92	09.54***
% 60 SP	10	52.10 \pm 6.43	08.09***

(*** p<0.001).



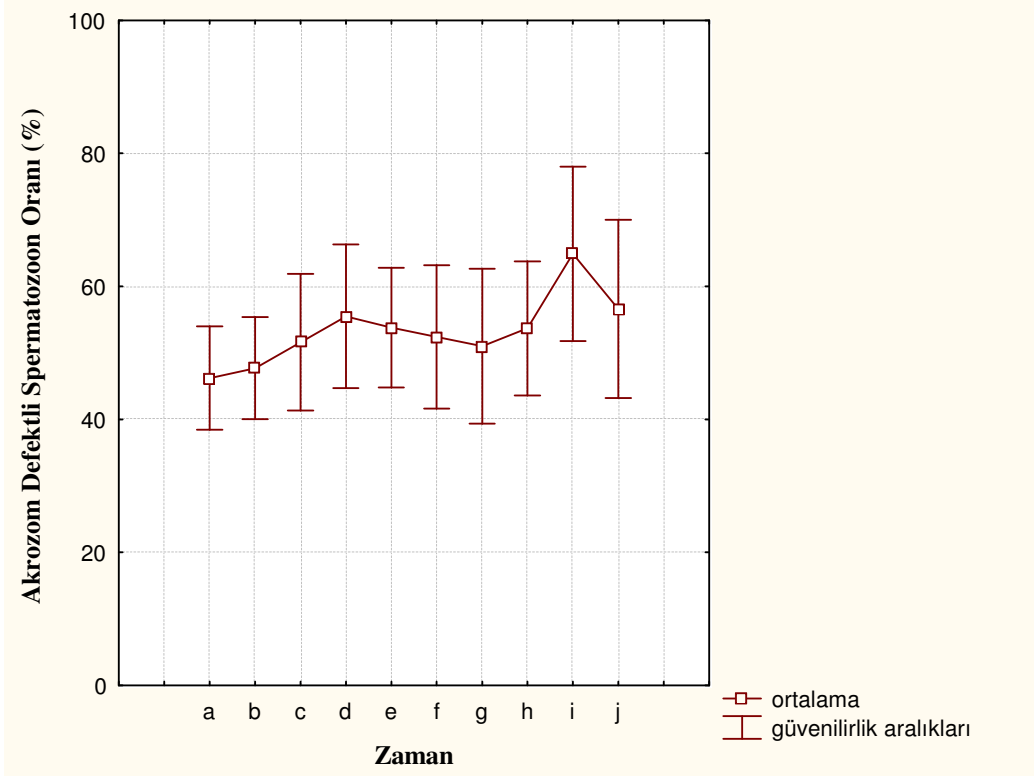
a:pooling, b:santrfuj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: 0. saat, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.saat

Şekil-9 Kontrol grubunda akrozom defekli spermatozoonların zamana bağlı değişimi. (p<0.05).



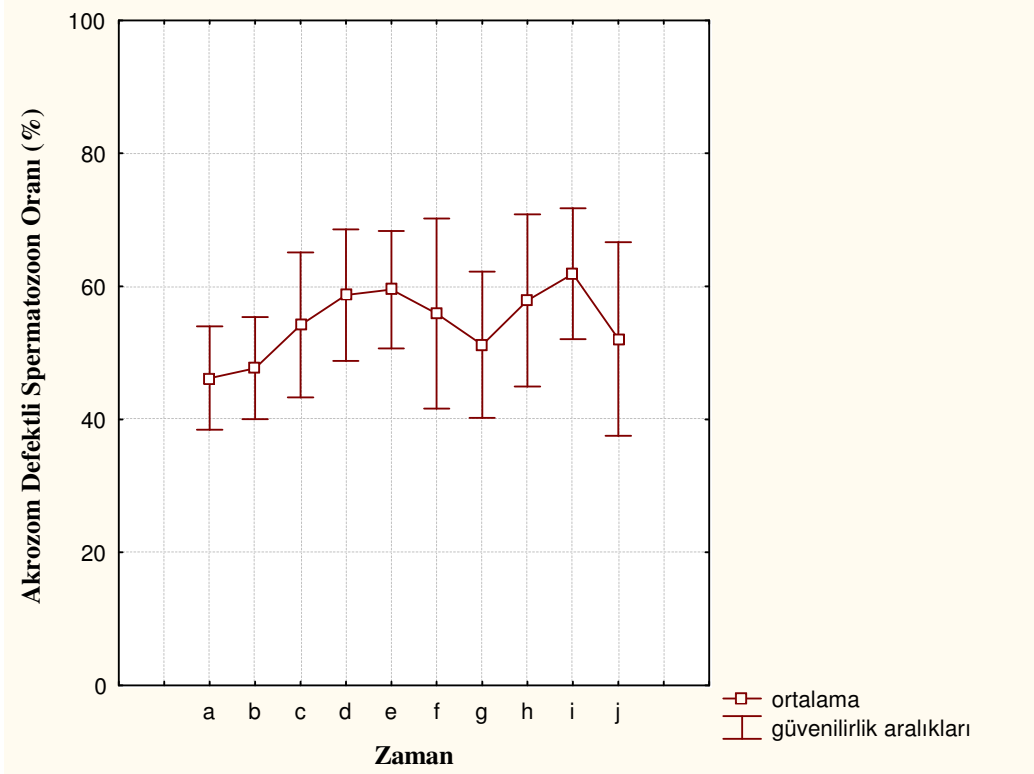
a:pooling, b:santrifüj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: başlangıç, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.

Şekil-10 %20 SP grubunda akrozom defekli spermatozoonların zamana bağlı değişimi. (p<0.05).



a: pooling, b: santrifüj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: başlangıç, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.

Şekil-11 %40 SP grubunda akrozom defektli spermatozoonların zamana bağlı değişimi. (p<0.05).



a:pooling, b:santrifüj sonrası, c: sulandırma sonrası, d: başlangıç, e: 12.saat, f: 24.saat, g: 36.saat, h: 48.saat, i: 60.saat ve j: 72.

Şekil-12 %60 SP grubunda akrozom defekli spermatozoonların zamana bağlı değişimi. (p<0.05).

Tablo-7 Deneme ve kontrol gruplarında motilite ortalamalarının(%), standart hata ve gruplar arası fark analiz sonuçları

GRUPLAR	Kontrol	%20 SP	%40 SP	%60 SP
Sulandırma sonrası				
Kontrol	72.00 ± 1.19	74.30 ± 0.96***	73.80 ± 1.56***	73.90 ± 1.26***
%20 SP			74.30 ± 0.96***	74.30 ± 0.96***
%40 SP				73.80 ± 1.56***
0.saat				
Kontrol	69.90 ± 1.35	69.40 ± 1.73***	68.50 ± 2.04***	67.20 ± 2.23***
%20 SP			69.40 ± 1.73***	69.40 ± 1.73***
%40 SP				68.50 ± 2.04***
12.saat				
Kontrol	62.30 ± 2.44	61.80 ± 3.00***	57.10 ± 2.20***	60.30 ± 2.44***
%20 SP			61.80 ± 3.00***	61.80 ± 3.00***
%40 SP				57.10 ± 2.20***
24.saat				
Kontrol	60.50 ± 2.49	61.10 ± 1.92***	58.70 ± 2.26***	60.50 ± 2.08***
%20 SP			61.10 ± 1.92***	61.10 ± 1.92***
%40 SP				58.70 ± 2.26***
36.saat				
Kontrol	52.30 ± 3.82	55.30 ± 3.31***	51.90 ± 4.19**	49.60 ± 4.14**
%20 SP			55.30 ± 3.31***	55.30 ± 3.31***
%40 SP				51.90 ± 4.19***
48.saat				
Kontrol	50.60 ± 2.71	52.20 ± 2.81***	51.60 ± 3.19***	52.10 ± 3.40**
%20 SP			52.20 ± 2.81***	52.20 ± 2.81*
%40 SP				51.60 ± 3.19**
60.saat				
Kontrol	43.70 ± 2.75	45.70 ± 2.34***	46.10 ± 3.04***	44.80 ± 2.66***
%20 SP			45.70 ± 2.34***	45.70 ± 2.34***
%40 SP				46.10 ± 3.04***
72.saat				
Kontrol	38.00 ± 2.00	39.20 ± 2.27***	38.80 ± 2.35***	37.20 ± 2.64**
%20 SP			39.20 ± 2.27***	39.20 ± 2.27**
%40 SP				38.80 ± 2.35**

(n=10, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Zamana bağlı olarak gruplar arasında değerlendirme yaptığımızda;

Motilitenin;

- Sulandırma sonrasında motilite, en düşük kontrol ve en yüksek %20 grubunda saptandı. Bütün gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli görüldü ($p<0.001$).
- 0. saatte motilite en düşük %60 en yüksek kontrol grubunda saptandı. Bütün gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli görüldü ($p<0.001$).
- 12. saatte motilite en düşük %40 en yüksek kontrol grubunda görüldü. Bütün gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli görüldü ($p<0.001$).
- 24. saatte motilite en düşük %40 en yüksek %20 grubunda görüldü. Bütün gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli görüldü ($p<0.001$).
- 36. saatte motilite en düşük %60 en yüksek %20 grubunda görüldü. %20 grubuyla kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.00$; %40 grubuyla kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$; %40 grubuyla %20 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$; %60 grubuyla kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$; %60 grubu ile %20 ve %40 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$ olarak bulundu.
- 48. saatte motilite en düşük kontrol en yüksek %20 grubunda görüldü. Kontrol grubuyla %20 ve %40 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$; kontrol grubuyla %60 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$; %40 grubuyla %20 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$; %60 grubuyla %20 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.05$ ve %60 grubuyla %40 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ olarak bulundu.
- 60. saatte motilite en düşük kontrol en yüksek %40 grubunda görüldü. Bütün gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.001$).
- 72. saatte motilite en düşük %60 en yüksek %20 grubunda görüldü. Kontrol grubunun %20 ve %40 gruplarıyla arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$; %20 ve %40 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$; %60 grubuyla diğer 3 grup arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ olarak bulundu.

Tablo-8 Deneme ve kontrol gruplarında ölü-canlı spermatozoon oranları ortalamalarının(%), standart hata ve gruplar arası fark analiz sonuçları

GRUPLAR	Kontrol	%20SP	%40SP	%60SP
Sulandırma sonrası				
Kontrol	07.92 ± 0.76	08.61 ± 0.57***	10.50 ± 0.88***	09.60 ± 1.27***
%20.SP			08.61 ± 0.57***	08.61 ± 0.57*
%40.SP				10.50 ± 0.88
0.saat				
Kontrol	09.03 ± 0.97	08.64 ± 1.21**	10.17 ± 1.83**	10.80 ± 1.68**
%20.SP			08.64 ± 1.21*	08.64 ± 1.21**
%40.SP				10.17 ± 1.83*
12.saat				
kontrol	10.74 ± 1.21	10.96 ± 2.19	10.17 ± 1.81	06.60 ± 1.06
%20.SP			10.96 ± 2.19**	10.96 ± 2.19**
%40.SP				10.17 ± 1.81***
24.saat				
Kontrol	11.94 ± 2.11	09.87 ± 1.77*	08.34 ± 1.68	12.90 ± 1.48**
%20.SP			09.87 ± 1.77**	09.87 ± 1.77**
%40.SP				08.34 ± 1.68 ***
36.saat				
Kontrol	13.50 ± 1.51	11.01 ± 0.98**	10.32 ± 1.10***	12.57 ± 1.47**
%20.SP			11.01 ± 0.98**	11.01 ± 0.98***
%40.SP				10.32 ± 1.10**
48.saat				
Kontrol	13.98 ± 1.12	12.27 ± 2.09	11.94 ± 1.69	12.90 ± 1.08
%20.SP			12.27 ± 2.09	12.27 ± 2.09
%40.SP				11.94 ± 1.69**
60.saat				
Kontrol	14.76 ± 0.79	14.28 ± 0.76**	13.59 ± 1.86***	14.85 ± 1.46***
%20.SP			14.28 ± 0.76***	14.28 ± 0.76***
%40.SP				13.59 ± 1.86
72.saat				
Kontrol	17.28 ± 0.94	15.30 ± 1.50***	15.93 ± 2.51**	16.89 ± 1.24***
%20.SP			15.30 ± 1.50	15.30 ± 1.50**
%40.SP				15.93 ± 2.51**

(n=10, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Zamana bağlı olarak gruplar arasında değerlendirme yaptığımızda;

Ölü-canlı oranının;

- Sulandırma sonrası %40'lık grupta en yüksek, kontrol grubunda en düşük olduğu görüldü. Kontrol grubu ile %20, %40 ve %60 grupları arasında istatistiksel fark $p<0.001$; %20 grubu ile kontrol ve %40 grupları arasında $p<0.001$; %20 ile %60 grupları arasında $p<0.05$ fark görülürken, %40 ile %60 grupları arasında istatistiksel fark görülmedi.
- 0. saatte ölü spermatozoon sayısının en fazla %60 grubunda ve en az %20'lik grupta olduğu görüldü. Kontrol grubu ile %20,%40 ve %60 grupları arasında istatistiksel fark $p<0.01$, %20grubu ile kontrol ve %60 grupları arasında istatistiksel fark $p<0.01$; %20 ile %40 grupları arasındaki fark $p<0.05$; %60 grubu ile kontrol ve %20 grupları arasındaki fark $p<0.01$ ve %60 grubu ile %40 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.05$ olarak bulundu.
- 12. saatte, en yüksek ölü spermatozoon oranının %20 grubunda ve en düşük ölü oranının % 60'lık grupta olduğu görüldü. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel fark görülmezken, %20 grubu ile %40 ve %60 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ ve %60 ile %40 grupları arasında istatistiksel fark $p<0.001$ olarak elde edildi.
- 24. saatte en yüksek ölü spermatozoon oranı %60 grubunda görülürken, en düşük ölü oranının %40 grubunda görüldü. Kontrol grubu ile %40 grubu arasında istatistiksel fark görülmezken, kontrol grubu ile %20 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.05$; kontrol ile %60 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ bulundu. %40 grubu ile %20 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$, %60 grubu ile kontrol ve %20 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ ve %60 grubu ile %40 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$ bulundu.
- 36.saatte en yüksek ölü spermatozoon oranı kontrol grubunda en düşük ölü spermatozoon oranı %40'lık grupta görüldü. Kontrol ile %20 ve %60 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$; kontrol grubu ile %40 grubu arasındaki fark istatistiksel olarak $p<0.001$ bulundu. %20 grubunun kontrol ve %40 gruplarıyla arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ ve %60 grubuyla arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$ bulundu. %60 grubunun kontrol ve %40 gruplarıyla arasında ki istatistiksel fark $p<0.01$ bulunurken, %20 grubuyla arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$ olarak tespit edildi.

- 48. saatte en yüksek ölü spermatozoon oranı kontrol grubunda, en düşük ölü spermatozoon oranı %40 grubunda saptandı. %40 ile %60 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ olarak saptanırken diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı.
- 60. saatte ölü spermatozoon oranı en yüksek %60 en düşük %40 gruplarında görüldü. Kontrol grubunun %20 grubuyla arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$; diğer 2 grupla arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$ olarak tespit edildi. %20 grubunun kontrol grubuyla arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$; diğer 2 grupla arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$ olarak bulundu. %60 grubu ile kontrol ve %20 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$ bulunurken, %60 ile %40 grupları arasında istatistiksel fark bulunamadı.
- 72. saatte ölü spermatozoon oranı en yüksek kontrol grubunda, en düşük ölü spermatozoon oranı %20 grubunda görüldü. Kontrol grubuyla %20 ve %60 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$, %40 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ bulundu. %20 ile %40 grupları arasında istatistiksel anlamda fark bulunamadı. %60 grubu ile %20 ve %40 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ tespit edildi.

Tablo-9 Deneme ve kontrol gruplarında akrozom defektli spermatozoon oranının(%) ortalamalarının, standart hata ve gruplar arası fark analiz sonuçları

GRUPLAR	Kontrol	% 20 SP	% 40 SP	% 60SP
Sulandırma sonrası				
Kontrol	45.60±3.87	50.70±2.16***	51.60±4.54**	54.20±4.81
%20 SP			50.70±2.16*	50.70±2.16
%40 SP				51.60±4.54
0.saat				
Kontrol	53.80±2.98	52.10±4.32	55.50±4.77	58.70±4.37**
%20 SP			52.10±4.32	52.10±4.32*
%40 SP				55.50±4.77*
12.saat				
Kontrol	53.00±6.68	52.60±5.89	53.80±3.98	59.50±3.90**
%20 SP			52.60±5.89	52.60±5.89**
%40 SP				53.80±3.98**
24.saat				
Kontrol	53.80±3.47	53.30±5.66	52.40±4.76*	55.90±6.31***
%20 SP			53.30±5.66	53.30±5.66**
%40 SP				52.40±4.76**
36.saat				
Kontrol	52.10±5.50	46.90±5.29*	51.00±5.15	51.20±4.85
%20 SP			46.90±5.29	46.90±5.29
%40 SP				51.00±5.15
48.saat				
Kontrol	58.50±6.29	54.50±6.06*	53.70±4.45	57.90±5.72
%20 SP			54.50±6.06*	54.50±6.06
%40 SP				53.70±4.45
60.saat				
Kontrol	54.70±5.14	59.80±5.65	64.40±5.69**	61.90±4.35**
%20 SP			59.80±5.65*	59.80±5.65**
%40 SP				64.40±5.69**
72.saat				
Kontrol	57.10±5.23	52.60±5.19**	56.60±5.92**	52.10±6.43*
%20 SP			52.60±5.19*	52.60±5.19*
%40 SP				56.60±5.92**

(n=10, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Zamana bağılı olarak gruplar arasında değerlendirme yaptığımızda;

Akrozomda;

- Sulandırma sonrası akrozom bozukluğu en düşük kontrol en yüksek %60 grubunda saptandı. Kontrol grubu ile %20 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$; kontrol grubu ile %40 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ bulundu. %20 ile %40 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.005$ olarak bulundu. Diğer bütün gruplar arası farklar istatistiksel açıdan önemli görülmedi.
- 0. saatte en düşük akrozom bozukluğu %20 grubunda en yüksek akrozom bozukluğu %60 grubunda görüldü. %60 grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$, %60 grubu ile %20 ve %40 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.05$ olarak bulundu. Diğer bütün gruplar arası farklar istatistiksel açıdan önemli görülmedi.
- 12. saatte akrozom bozukluğu en düşük %20 en yüksek %60 grubunda görüldü. %60 grubu ile diğer gruplar arasındaki fark $p<0.01$ bulunurken, diğer bütün gruplar arası farklar istatistiksel açıdan önemli görülmedi.
- 24. saatte en düşük akrozom bozukluğu %40 grubunda en yüksek akrozom bozukluğu %60 grubunda görüldü. Kontrol grubu ile %40 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$, kontrol grubu ile %60 grubu arasındaki istatistiksel fark $p<0.001$ olarak bulundu. %60 grubu ile %20 ve %40 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ olarak bulundu. %20 ile kontrol ve %40 grupları arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemli görülmedi.
- 36. saatte akrozom bozukluğu en düşük %20 grubunda en yüksek %60 grubunda görüldü. Sadece kontrol grubu ile %20 grubu arasında ki istatistiksel fark $p<0.05$ bulunurken diğer bütün gruplar arasında farklar istatistiksel önemli görülmedi.
- 48. saatte en düşük akrozom bozukluğu oranı %40 grubunda, en yüksek akrozom bozukluğu oranı %60 grubunda bulundu. Sadece %20 grubu ile kontrol ve %40 grupları arasında istatistiksel olarak fark saptandı ($p<0.05$) diğer bütün gruplar arasında farklar istatistiksel önemli görülmedi.
- 60. saatte akrozom bozukluğu oranı en düşük kontrol grubunda en yüksek %40 grubunda görüldü. Kontrol grubu ile %20 grubu arasında istatistiksel fark görülmedi. Kontrol grubu ile %40 ve %60 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ olarak bulundu. %20 ile %40 grupları arasındaki istatistiksel fark $p<0.05$

olarak bulundu. %60 grubu ile diğer bütün gruplar arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$ olarak bulundu.

- 72. saatte akrozom bozukluğu oranı en düşük %60 en yüksek kontrol grubunda tespit edildi. Kontrol grubunun %20 ve %40 gruplarıyla arasındaki istatistiksel fark $p<0.01$; %60 grubuyla arasındaki istatistiksel fark $p<0.05$ olarak bulundu. %20 grubunun %40 ve %60 gruplarıyla arasında ki fark $p<0.05$ olarak bulundu. %40 ile %60 grupları arasındaki fark $p<0.01$ olarak tespit edildi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırma değişik oranlarda alabalık seminal plazması içeren koç spermasının TRİS sulandırıcısı ile sulandırılarak 4⁰C'ta 72 saat saklama süresince spermatozoon viabilitesi, motilite ve akrozom bütünlüğünün incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada pooling sonrası motilite, yoğunluk, kitle hareketi, pH, sırasıyla %81.00±1.00, 3.55x10⁹/ml, +++, 6.4-6.8 olarak bulundu. Bu değerler bazı araştırmacıların (1,9,11-14,33) bildirdiği sınırlar içerisinde bulunmaktadır. Çalışmanın yapıldığı Ağustos ayı Bursa bölgesinde koçlar için sezon başlangıcıdır. Koyunların mevsimsel poliöstrik hayvanlar olması nedeniyle, koçların spermatolojik özellikleri arasında da mevsimsel farklar bulunmaktadır (49). Bu farklar yapılan bazı araştırmalarla ortaya konmuştur (50,51,54).

Yapılan çalışmada pooling yapılmış spermada motilite oranı çalışma ile aynı dönemde alınan sperma örneklerinde Günay ve arkadaşlarının (50) bildirdiği %73.3, Türk ve arkadaşlarının (51) bildirdiği %68.99 ve Gündoğan ve arkadaşlarının bildirdiği (54) %71.67 motilite oranlarından yüksek; mevsim belirtilmeden Aksoy ve arkadaşlarının (14) bildirdiği %65.5, Uysal ve arkadaşlarının (49) bildirdiği %80 oranlardan yüksek fakat yine mevsim bildirilmeden Soylu ve arkadaşlarının (13) bildirdiği %89.3 ve Özkoca ve arkadaşlarının (11) bildirdiği %90 oranından düşük bulunmuştur.

Sunulan çalışmada bulunan ortalama yoğunluk, mevsim içi (1,11-14,49) ve mevsim dışı yapılan çalışmalarda (50,51,54) bildirilen spermatozoon yoğunluğundan yüksek bulundu. Genel olarak değerlendirildiğinde koçlardan alınan ejakülatlarda saptanan spermatolojik özelliklerin normal sınırlar içinde yer aldığı söylenebilir.

Koçlarda spermatozoon membranındaki bozukluklar, spermaya 35-37⁰C'de yapılan işlemler, soğutulması sırasında maruz kaldığı soğuk şoku ve inkübasyonu sırasında şekillenen yaşlanmadan kaynaklanmaktadır (4). Yapılan bu çalışmada da zamana bağlı olarak motilitenin azaldığı, ölü spermatozoon ve akrozom bozukluğu oranlarının arttığı görülmüştür.

Türlere göre spermatozoonlar arasında santrifüj işlemine duyarlılıkta fark olmakla birlikte, insan ve koç spermasında santrifüj sonrasında kalıcı bozukluklar olabilmektedir (5). Kimi spermatozoonlarda motilite olduğu halde membran bozulması görülmektedir (40,53). Araştırmada santrifüj işlemi sonrasında motilite azalmış, ölü spermatozoon ve akrozomal bozukluk oranı artmıştır.

In vitro yapılan ve olumsuz sonuç alınan kimi çalışmaların devamında yüksek fertilitte oranları saptanırken, bazı çalışmalarda da tam tersi sonuç alınabilmektedir (55). Ayrıca viabilite ve morfolojideki bozukluk olduğu durumlarda daha fazla sayıda spermatozoon kullanılarak yapılan döllemelerle farkın kapatılabileceği, ancak bilindiği üzere tohumlamada ki asıl amacın, daha az sayıda spermatozoon kullanmak olduğu bilinmektedir. (1,43,55)

Fertilizasyonda oranın düşmesine neden olan bozuklukların spermanın soğutulması ve saklanması sırasında mı,yoksa uterusun ovidukta giderken geçirdiği süre içinde mi olduğunun daha fazla araştırılması gerekliliği vurgulanmaktadır (45).

Ataman ve arkadaşları (56) İvesi ıki koçlarda taze spermada %87,3 motilite, %2,8 ölü spermatozoon oranı, %0,5 akrozom defekti, %4,1 toplam anormal spermatozoa oranı; TRİS-glikoz ile sulandırma sonrası %86 motilite, %3,5 ölü spermatozoa oranı, %1.2 akrozom defekti, %4,1 toplam anormal spermatozoon oranı elde etmişlerdir (56). Motilite, ölü spermatozoon oranı ve akrozom defekli spermatozoon oranı sunulan çalışmada pooling yapılmış taze spermada sırasıyla %81, % 9.81, %46.2 , TRİS ile sulandırılan spermada %72.00±1.19, %7.92±0.76, %45.60±3.87, %20 SP grubunda %74.30±0.96, %8.61±0.57, %50.70±2.16, %40 SP grubunda %73.80±1.56, %10.50±1.27, %51.60±4.54, %60 SP grubunda %73.90±1.26, %9.60±1.27, %54.20±4.81 olarak bulunmuştur. Çalışmada bulunan motilite değerleri Ataman ve arkadaşlarının bulduğu değerlerden düşük, ölü spermatozoon oranı ve akrozom defekli spermatozoon oranı ise yüksek bulunmuştur.

Soylu (13), TRİS sulandırıcısı kullanarak yaptığı çalışmada, ilk sulandırma sonrası motiliteyi %80,4; ölü spermatozoon oranını %3,4, akrozomal bozukluk oranını %2,3 olarak bildirmiştir. Çalışmada TRİS ile sulandırma sonrası motilite oranı Soylu'nun (13) bildirdiği değerlerden düşük, ölü spermatozoon ve akrozomal oranları yüksek bulunmuştur.

Paulenz ve arkadaşları (57)TRİS, sodyum sitrat ve sütlü sulandırıcılarla 5°C ve 20°C'de yaptıkları bir çalışmada 30.saat sonunda TRİS'in diğer sulandırıcılara ve 5°C'nin 20°C'ye göre daha iyi motilite, akrozom ve membran bütünlüğü sağladığını bildirmişlerdir (57). Yapılan çalışmada ortamda %20 ve %40 oranlarında alabalık seminal plazması bulunmasının motilite, canlı spermatozoon ve akrozom oranları üzerine olumlu etki yaptığı, bu olumlu etkinin özellikle 24. saatten sonra önemli olduğu görülmektedir.

Koç spermasını yağsız inek sütü ile 1:3 oranında sulandırıp, 2-3 saat içerisinde 5°C'ye soğuttuktan sonra inceleyen Tiwari ve arkadaşları (58), 0, 8 ve 24. saatlerdeki

muayenelerinde spermatozoon motilitesini %88.0, %68.4, ve %50 olarak bulmuşlardır. Sunulan çalışmada kontrol, %20 SP, %40 SP ve %60 SP gruplarında motilite sırasıyla 0. saatte %69.9, %69.40, %68.50, %67.20; 24. saatte %60.50, %61.10, %58.70 ve %60.50 bulunmuştur. Bu değerler Tiwari ve arkadaşlarının (58) 0. saatte buldukları değerlerden düşük 24. saatte buldukları değerlerden yüksektir.

Gökçen ve arkadaşları (59), Merinos ırkı koçlarda sodyum sitrat-glikoz-yumurta sarısı kullanarak yaptıkları bir dondurma çalışmasında, ilk sulandırma ve +5°C'ye kadar soğutmada sırasıyla motilite oranını %82 ve %76, akrozom bozukluk oranını ise %3.17 ve %7.3 olarak bulmuşlardır. Yapılan çalışmada motilite, kontrol, %20 SP, %40 SP ve %60 SP gruplarında sulandırma sonrası sırasıyla %72±1.19 , %74.30 ±0.96, %73.80±1.56, %73.90±1.26 ve +5°C'de sırasıyla %69.90±1.35, %69.40±1.73, %68.50±2.04, %67.20±2.23 olarak saptanmıştır. Akrozom defektli spermatozoon oranı ise kontrol, %20 SP, %40 SP, %60 SP gruplarında sulandırma sonrası sırasıyla, %45.60±3.87, %50.70±2.16, %51.60±4.54, %54.20±4.81 ve +5°C'de sırasıyla %53.80±2.98, %52.10±4.32, %55.50±4.77 ve %58.70±4.37 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada Gökçen ve arkadaşlarının bulduğu değerlerle karşılaştırıldığında motilite değerleri daha düşük akrozom defektli spermatozoon oranları daha yüksektir.

Triladyl-yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırılan koç spermasında sulandırma sonrası taze, soğutulmuş ve spermada, viabilite ve motilite sırasıyla %60±8.3, %85±3.5; %51±7.5, %62±2.3 bulunmuştur(31). Sunulan çalışmada ise ilk sulandırma sonrası motilite, sırasıyla kontrol, %20 SP, %40 SP ve %60 SP gruplarında %72, %74.30±0.96, %73.80±1.56, %73.90±1.26 olarak +5°C'de sırasıyla kontrol, %20 SP, %40 SP, %60 SP gruplarında %69.9±1.35, %69.40±1.73, %68.50±2.04, %67.2±2.23 olarak; akrozom bozukluğu sulandırma sonrası sırasıyla kontrol, %20 SP, %40 SP, %60 SP gruplarında %45.60±3.87, %50.70±2.16; %56,90±3,88; %55,70±3,70; +5°C'de %53,80±2.98, %52,10±4,32, %55,50±4,77, %58,70±4,37 olarak saptanmıştır. Sunulan çalışmada motilite ve viabilite değerleri sulandırma sonrası ve +5°C'de Ollero ve arkadaşlarının bulduğu değerlerden düşük bulunmuştur.

Soylu (10), Tris, Tris+TALP+%15 boğa seminal plazması ve Tris+TALP+%30 boğa seminal plazması ile sulandırıp 5⁰C'de 48 saat sakladığı koç spermasında motiliteyi ve anormal spermatozoon oranını verilen sulandırıcı sırasına göre sulandırma sonrasında sırasıyla; %86.5±10.01, %4.5±3.50, %85.0±11.30, %4.6±2.72, %82.0±16.53, %6.5±3.22; 24. saatte %52.0±13.98, %15.5±3.50, %66.5±11.56, **%13.7±6.07, %56.5±19.73,**

%16.4±5.13 ve 48. saatte ise %43.5±11.32, %25.2±10.04, %62.5±10.87, %12.6±4.35 %56.5±18.72, %18.5±5.02 olarak bildirmiştir.

Yapılan çalışmada kontrol, %20 SP, %40 SP ve %60 SP gruplarında motilite ve akrozom defekti oranları sırasıyla 5⁰C'de %69.90,%53.80; %69.40,%52.10; %68.50,%55.50; %67.20, %58.70 24. saat sonunda %60.50,%53.80; %61.10, %53.30; %58.70,%52.40; %60.50;%55.90 ve 48 saat sonunda %50.60,%58.50; %52.20,%54.50; %51.60,%53.70; ve %52.10, %57.90 bulunmuştur. Soylu'nun değerlerinden motilite değerleri düşük, akrozom defektli spermatozoon oranı ise yüksek bulunmuştur.

Petruzzi ve arkadaşlarının (60), süt tozu, yağsız süt, %20 yumurta sarısı içeren süt tozu, %20 yumurta sarısı içeren süt tozu, sodyum sitrat sulandırıcısı ve TRİS sulandırıcısı ile yaptıkları çalışmada; motiliteyi sırasıyla 24. saatte %60.55±10.40, %56.29±12.52, %60.33±11.20, %60.55±11.88, %61.66±11.57 ve %66.88±9.95; 48. saatte, %50.74±12.06, %45.74±15.36, %56.22±11.53, %55.22±12.70, %52.88±14.24, %61.55±14.09; 72. saatte %35.18±14.83, %30.74±20.74, &47.33±16.00, %44.88±16.18, %42.22±15.79 ve %53.33±18.09 olarak bildirmiştir. Sunulan çalışmada, TRİS ile sulandırılan kontrol grubunda motilite 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla %60.50±2.49, %50.60±2.71 ve %38.00±2.00 olarak bulunmuştur. Bu değerler Petruzzi ve arkadaşlarının (60)TRİS sulandırıcısı ile aldıkları sonuçlardan düşüktür.

El Gaafary ve arkadaşları (61) Tris+fruktoz+yumurta sarısı içerisine 300 ve 600 mg oranında PGF_{2α}/ml ekleyerek ve eklemeden (kontrol) 1000x10⁶ spermatozoon/ml olacak şekilde sulandırarak 5⁰C'de sakladıkları koç spermalarında, 24, 48 ve 72. saatlerde motiliteyi kontrol grubunda, %63, %53 ve %35, 300 mg PGF_{2α} eklenen grupta ,%73, %62 ve %45, 600 mg PGF_{2α} eklenen grupta da, %70, %62 ve %44 olarak saptamışlardır. Sunulan çalışmada kontrol, %20 SP, %40 SP ve %60 SP gruplarında motilite sırasıyla 24. saatte %60.50, %61.10, %58.70 ve %60.50; 48. saatte, %50.60, %52.20, %51.60, %52.10, 72. saatte %38.00, %39.20, %38.80 ve %37.20 bulunmuştur. Değerler karşılaştırıldığında yapılan çalışmada 24 ve 72. saatlerde kontrol grubundaki motilitenin daha yüksek olduğu buna karşılık diğer saat ve gruplarda El Gaafary ve arkadaşlarının motilite değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada motilite diğer araştırmacıların TRİS ile yapılan çalışmalarda buldukları sonuçlardan daha düşük, ölü spermatozoon ve akrozomal bozukluk oranları daha yüksek olduğu görülmüştür

Seminal plazmanın içindeki bazı maddelerin motilite(62) ve soğuk şokuna karşı direnci artırdığı (63) bildirilirken, bazı diğer çalışmalar da seminal plazmanın sperm motilitesi (64,65) viabilitesi (66,67) veya dondurma çözündürme sonrası hayatta kalmasına (68,69) yıkıcı etkileri olduğu da bildirilmiştir. Bu çelişki, spermatozoon üzerinde düşük moleküler ağırlıklı seminal plazma proteinlerinin bozucu etkilerinin olmasıyla açıklanmıştır(70) Asworth ve arkadaşlarının (71), koç spermasında seminal plazmadan ayrılan spermatozoonların iyileştirici oranlarının daha iyi olduğunu fakat bu durumun sulandırma oranıyla da ilgisi bulunduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar koç spermasının seminal plazma yokluğunda, aşırı sulandırma sonrasında çabuk öldüğünü fakat sulandırma medyumuna %10 kadar homolog seminal plazma ilave edildiğinde motilite ve viabilite kaybının olmadığını göstermişlerdir. Sunulan çalışmada sulandırma sonrası 4°C'den sonra 0.ve 72.saatlerde %20 SP, 12.saatte %60 SP ve 24-36-48-60. saatlerde %20 SP içeren gruplarda ölü spermatozoon oranı en düşük bulunmuştur. Soğuk şokuna maruz kalmış koç spermasına seminal plazma eklendiğinde soğuk şokunun neden olduğu membran bozukluklarının düzeldiği bildirilmiştir (5,72) Bu düzelmeye Barrios ve arkadaşları (16) tarafından elektron mikroskop ve biyokimyasal markırlarla da gösterilmiştir(16). Yapılan çalışmada motilite diğer araştırmaların TRİS ile yapılan çalışmalarda buldukları sonuçlardan daha düşük, ölü spermatozoon ve akrozomal bozukluk oranları daha yüksek bulunmuştur.

Sunulan çalışmada ortamda hangi oranda olursa olsun alabalık seminal plazmasının olması 24. saatten sonra canlı spermatozoon oranına olumlu etki yapmıştır. Ortamda %20 ve %40 oranında alabalık seminal plazmasının olması 24. saatten sonra kontrol grubuna ve %60 alabalık seminal plazması bulunan gruba göre motiliteyi olumlu yönde etkilemiştir. Ortamda, %20 ve %40 oranlarında alabalık seminal plazmasının olması kontrol ve %60 alabalık seminal plazmalı gruba göre akrozom üzerine olumlu etki yapmış ve bu olumlu etki 24. saatten sonra önem kazanmıştır. Çalışmada, motilite kontrol grubunda 0 ve 12 saatlerde, %20 SP grubunda sulandırma sonrası, 24, 36, 48 ve 72. saatlerde, %40 SP grubunda 60. saatte en yüksek bulunmuştur. %60 SP grubunda motilitenin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu bir zaman saptanamamıştır. Çalışmada akrozom defektli spermatozoon sayısı 72. saatte kontrol grubunda diğer tüm zamanlarda %60 SP grubunda en yüksek bulunmuştur. Akrozom defektli spermatozoon oranı kontrol grubunda sulandırma sonrasında, 60. saatte, %20 SP grubunda 0.-12-36. saatlerde ve %40 SP grubunda 24 ve 48. saatlerde en düşük bulunmuştur.

Sonuç olarak sunulan çalışmada seminal plazmadan ayrılmış ve TRİS ile sulandırılan koç spermasına %20-%40 oranlarında alabalık seminal plazması eklenmesinin motilite, canlı spermatozoon ve akrozomal bozukluk oranları üzerine olumlu etki yaptığı saptanmıştır.

Alabalık seminal plazmasının farklı sulandırıcılarla ve farklı oranlar denenerek yeni çalışmaların yapılmasında ve bu çalışmaların *in vivo* ortamda dondurma ve fertilitte denemeleriyle desteklenmesinin yararlı olabileceği düşünülmektedir.

EKLER



Şekil-13 Çalışmada kullanılan üç adet ivesi ırkı koç



Şekil-14 Suni Vajen



Şekil-15 Koçlardan sperma alınması



Şekil-16 Çalışmada kullanılan sulandırıcı ve boyalar



Şekil-17 Santrifüj sonrası TALP ve koç seminal plazmasının ayrılması



Şekil-18 Isıtmalı faz-kontrast mikroskopta motilite sayımı



Şekil-19 Frotillerin hazırlanması



Şekil-20 Numunelerin +4°C' da saklanması

KAYNAKLAR

- 1 SEVİNÇ A. Dölerme ve Sun'i Tohumlama. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1884.
- 2 SALAMON S,MAXWELL W.M. Storage of ram semen. *Animal Reproduction and Science* 18;62(1-3): 77-111, 2000.
3. ÖZGÜR A, YAŞAR A, BAŞAĞAÇ T. Türkiye'de suni tohumlamanın tarihsel gelişimi. II. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi Bildiri Kitabı. Konya, sayfa 5, 2002.
4. LOPEZ A, SODERQUIST L, RODRIQUEZ-MARTINEZ H. Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 40(1):1-9, 1999.
5. PEREZ-PE R, MUINO-BLANCO T, CEBRIAN-PEREZ JA. Sperm washing methods alters the ability of seminal plasma proteins to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *International Journal of Andrology*, 24:352-359, 2001.
6. TÜMEN H. Çeşitli tekniklerle sulandırılıp tohumlamada kullanılan koç spermasının spermatolojik özellikleri ve döl verimi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, İstanbul, 1990
7. MAXWELL WMC, WATSON PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction and Science*, 42:55-65, 1996.
8. DAŞKIN A. Sığırcılık işletmelerine reprodüksiyon yönetimi ve suni tohumlama. *Aydan Web Ofset*, Ankara, sayfa:86-97, 2005.
9. İLERİ K, AK K, PAPUÇÇUOĞLU S, BİRLER S. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama . Ders notu:84, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayinevi, İstanbul, 1998.
10. SOYLU MK. Koç spermasının 5⁰C'de saklanmasında boğa seminal plazmasının etkisi. *YYÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(2): 21-26, 1997
11. ÖZKOCA A. Çiftlik hayvanlarında reprodüksiyon ve Sun'i tohumlama. No: 3209, İstanbul Üniversitesi Vetetiner Fakültesi Yayınları, İstanbul, 1984.
12. GÖKÇEN H. Koç spermasının kimi özellikleri, dondurulması ve dondurulan spermanın döl verimi üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara, 1976.
13. SOYLU MK. Çeşitli sulandırıcılar ve yöntemler kullanılarak dondurulan koç spermasının bazı spermatolojik özellikleri üzerine araştırmalar. Doktora tezi. I.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul. 1988.
14. AKSOY M, ATAMAN MB, KARACA F, KAYA A, TEKELİ T. Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait çeşitli ırklardan koçların spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10(1-2):111-112, 1994.
15. HAFEZ ESE. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. Editor: HAFEZ ESE. *Reproduction in Farm animals*, 5th edition Lea-Febiger, Philadelphia, page:170-231, 1987.
16. BARRIOS B, PEREZ-PE R, GALLEGO M, TATO A, OSADA J, MUINO-BLANCO T, CEBRIAN-PEREZ JA. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 63:1531-1537, 2000.
17. PEREZ PE R,BARRIOS B, CEBRIAN PEREZ JA, MUINO-BLANCO T. Seminal plasma proteins reduce protien tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold shocked ram spermatozoon. *Molecular Reproduction and Devolepment*, 61:226-233, 2002.
18. BARRIOS B, FERNANDEZ-JUAN M, MUINO-BLANCO T, CEBRIAN-PEREZ J.A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoon against cold shock. *Journal of Andrology*, 26(4):539-549,2005. (Abstr).

19. MAXWELL WMC, EVANS G, MORTIMER ST, GILLAN L, GELLATLY ES, MCPHIE CA. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction and Fertility*, 11:123-126,1999. (Abstr).
20. SCHEMBRI MA, MAJOR DA, SUTTIE JJ, MAXWELL WMC, EVANS G. Capacitation-like changes in equine spermatozoon throughout the cryopreservation process. *Reproduction Fertility and Devolepment*, 14:225-233, 2002.
21. VADNAIS ML, KIRKWOOD RN, TEMPELMAN RJ, SPRECHER J, CHOU K. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Animal Reproduction and Science*, 87:121-132, 2005.
22. MAXWELL WMC, WELCH R, JOHNSON LA. Viability and membrane integrity of spermatozoon after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction Fertility and Devolepment*, 8:1165-1178, 1997.
23. OLLERO M, CEBRIAN-PEREZ JA, MUINO-BLANCO T. Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. *Journal of Andrology*, 18 (6):732-739, 1997. (Abstr).
24. BASS JW, MOLAN PC, SHANNON P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoon. *Journal of Reproduction and Fertilisation*, 68:275-280, 1983.
25. YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization. Editors: KNOBIL E, NEILL JD. *The physiology of Reproduction*, Vol, 1, 2nd ed., Raven Press, New York, page:189-317.1994.
26. YUDIN AI, GENERAO SE, TOLLNER TL, TREECE CA, OVERSTREET JW, CHERR GN. Beta.Defensin126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. *Biology of Reproduction*, 73(6):1243-1252, 2005.
27. ALGHAMDI AS, FOSTER DN. Seminal plasma DNase frees spermatozoon entangled in neutrophil extracellular traps. *Biology of Reproduction*, 73(6):1174-1181, 2005.
28. GÜNDÜZ H, DOĞAN İ, EKİN S. Yemlerine vitamin A ilave edilen alabalıklarda (*Oncorhynchus Mykiss*) seminal plazmanın biyokimyasal bileşiminin saptanması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 13(1-2):64-68, 2002.
29. TEKİN N, SEÇER S, BOZKURT Y, KAYAM S. Gökkuşuğu alabalıklarında (*oncorhynchus mykiss*W., 1972) yaşın spermatolojik özellikler üzerine etkisi., *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 27:37-44,2003.
30. VISHWANATH R, SHANNON P. Do sperm cells age? A review article of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reproduction Fertility and Development.*, 9:321-331, 1997.
31. OLLERO M, PEREZ-PE R, MUINO-BLANVO T, CEBRIAN-PEREZ JA. Improvement of ram semen cryopreserved protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, 37:1-12, 1998.
32. MAXWELL WMC, LANDERS AJ, EVANS G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*, 43:1201-1210, 1995.
33. ATAMAN MB. Koyun keçilerde reproduksiyon ve suni tohumlama. Editör: ÇOYAN K. *Evcil hayvanlarda dölerme ve suni tohumlama*, Konya, sayfa:137-154,2002.
34. WATSON PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61:481-492, 2000.
35. D'ALESSANDRO AG, MARTEMUCCI G, COLONNA MA, BELLITTIA. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insamination as effected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, 55:1159-1170, 2001.

36. YOSHIDA M. Conservation of Sperms: Current status and new trends. *Animal Reproduction Science*, 60-61:349-355, 2000.
37. HAFEZ ESE. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. Editor: HAFEZ ESE. *Reproduction in Farm animals*, 5th edition Lea-Febiger, Philadelphia, page 571-600, 1987.
38. BILLARD R. Artificial Insamiation in Fish. Editor: LAMBING GE. *Marshall's Physiology of Reproduction*. 4th edition Churchill Livingstone, London, page:870-888,1990.
39. MAXWELL WMC, STOJANOV T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction Fertility and Development*, 8:1013-1020, 1996.
40. GIL J, SODERQUIST L, RODRIQUEZ-MARTINEZ H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, 54:93-108, 2000.
41. MAXWELL WMC, LANDERS AJ, EVANS G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*, 43:1201-1210, 1995.
42. RITAR AJ, BALL PD. The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insamiation. *Animal Reproduction Science*, 31:249-262, 1993.
43. MAXWELL WMC, SALAMON S. Liquid storage of ram semen: A rewiw. *Reproduction and Fertility*, 5:613-638, 1993.
44. MENCHACA A, PINCZAK A, QUEIROLO D. Storage of ram semen at 5⁰C: effects of preservation period and timed artificial insamiation on pregnancy rate in ewes. *Animal Reproduction*, 2(3):195-198, 2005.
45. FERNANDEZ-ABELLA D. PREVE MO. VİLLAGAS N. İnsemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*, 60 (1):21-26, 2003.
46. COLAS G. Seasonal variations of sperm quality in adult Ile-de-France rams. II. Fertilizing ability and its relation to qualitative criteria in vitro. *Reproduction, Nutrition Devolepment.*, 21(3):399-407, 1981. ABSTRACT
47. ISLAM R, AHME K, DEKA BC. Effect of Holding and washing on the Quality of Goat Semen. *Small Ruminant Research (In pres)*
48. BARAN A, AK K, İLERİ İK, SOYLU MK. Effects of adding bull seminal plasma to ram semen extenders on post-thaw spermatozoa motility and morphology. *The Indian Veterinary Journal*, 780-783, 2004.
49. UYSAL O, TAŞDEMİR U, KİNİT H, ÖZCAN İ. Akkaraman ırılı koçlarda başlıca spermatolojik özellikler. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 43(1):23-28, 2003.
50. GÜNAY Ü, NUR Z, DOĞAN İ, BAŞPINAR B, SOYLU MK. Sıfat sezonuna geçiş döneminde ve sıfat sezonunda koç spermasının dondurulabilirliğinin araştırılması. *Uludağ University Journal of the Faculty of the Veterinary Medicine*, 22(1-2-3):81-85, 2003.
51. TÜRK G, DEMİRCİ E. Akkaraman koçların serum testesteron düzeylerinde ve spermatogenesisindeki mevsime bağlı değişikliklerin araştırılması. I. Spermatolojik özelliklerle arasındaki ilişki. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 19(1):21-27, 2005.
52. DEMİRCİ E. İvesi koçlarının spermatolojik özellikleri ve sperma miktarının hayvanın yaşı ve testis hacmi ile ilişkisi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(12):98-106, 1993.
53. GARCÍA-LOPEZ N, OLLERO M, MUINO-BLANCO T, CEBRIAN-PEREZ JA. A dextran swim-up procedure for seperation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology*, 46:141-151, 1996.

54. GÜNDOĞAN M, TEKERLİ M, UÇAR M, TÜRKMENOĞLU I. Effect of diluents on motility of ram sperm during storage at 5°C. *Archives of Andrology*, 49:69-75, 2003.
55. GRASA P, PEREZ-PE R, BAGUENA O, FORCADA F, ABECIA A, CEBRIAN-PEREZ JA, MUINO-BLANCO T. Ram sperm selection by a Dextran/Swim up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *Journal of Andrology*, 25(6):982-990, 2004.
56. ATAMAN MB, YILDIZ C, KAYA A, DÜZGÜN H, LEHİMCİOĞLU NC. Farklı ırklara ait koç spermalarının dondurma işlemi aşamalarında ve çözüm sonu şekillenen morfolojik bozuklukların tespiti. *Hayvancılık araştırma Dergisi*, 9,(1-2):18-22, 1999.
57. PAULENZ H, SODERQUEST L, PEREZ-PE R, BERG KA. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 15;57(2):823-836, 2002. ABSTRACT
58. TIWARI SB, SIRIVASTAVA AK, SAHNI KL. Some metabolic changes in ram semen stored in the milk diluent. *Indian Veterinary Journal*, 54(2):111-115, 1997.
59. GÖKÇEN H, AŞTI RN, KOZANDAĞI M. Çeşitli ekilibasyon süreleri ve çözme ısılarının donmuş koç spermatozoonlarının motilitesi ve akrozom bozuklukları üzerine etkisi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2(1):51-58, 1983.
60. PETRUZZI V, TARANTINI S, ROYCHOUDHURY PN. Effect of different semen diluents on survival of ram spermatozoa at 5°C. *Zentralblatt für Veterinarmedizin*, A23:556-561, 1976.
61. GAAFARY MN. Survival rate and fertility of rabbit sperm supplemented with prostaglandin F₂alpha. The Third Egyptian British Conference on Animals, Fish and Poultry Production, Alexandria, Egypt, page 679-683, 1989.
62. GRAHAM JK. Effect of seminal plasma on the motility of the epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*, 41:1151-1162, 1994.
63. BERGER T, CLEGG E. Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock. Initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. *Analytical biochemistry*, 60:1295-1302, 1985.
64. DE LAMİRANDE E, GAGNON C. Origin of a motility inhibitor within the male reproductive tract. *Journal of andrology*, 5:269-276, 1984.
65. IWAMATO T, TANAKA H, OSAA T, SHINAGAWA T, OSAMURA Y, GAGNON C. Origin of a sperm motility inhibitor from boar seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*. 36:475-481, 1993.
66. GARCIA MA, GRAHAM EF. Factors affecting the removal of low-molecular weight fractions (LMWF) from egg yolk and seminal plasma in extended semen by dialysis: Effect of post-thaw sperm survival. *Cryobiology*, 24:437-445, 1987.
67. DOTT HM, HARRISON RAP, FOSTER GCA. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62:193-197, 1979.
68. WATSON PF. The effect of cold shock on sperm cell membranes. Editors: MORIS GJ, CLARK A. *Effects of low temperatures on biological membranes*. Academic press, London, page:189-218, 1981.
69. RITAR AJ, SALAMON S. Effect of seminal plasma and its removal and off egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen thawed spermatozoa of Angor goat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 35:305-312, 1982.
70. OLLERO M, GARCIA-LOPEZ N, PEREZ-PE R, CEBRIAN-PEREZ JA, MUINO-BLANCO T. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Reproduction and Fertility Development*, 9:381-390, 1997.

71. ASHWORTH PJC, HARRISON RAP, MILLER NGA, PLUMMER JM, WATSON PF. Survival of ram spermatozoa at high dilution: Protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reproduction and Fertility Development*, 6:173-180, 1994.
72. PEREZ-PE R, CEBRIAN-PEREZ JA, MUINO-BLANCO T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, 56:425-434, 2001.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın her aőamasında yol gosteren ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal Soylu'ya;

Çiftlik çalışmaları sırasında yardımcı olan Doç.Dr. İbrahim Doğan, Doç. Dr. Hakan Sağırkaya ve Arő. Gör. Burcu Başpınar'a

İstatistik çalışmalarında yardımcı olan Dokuz Eylül Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü'nden Dr. Erkan Demirkurt'a teőekkürü borç bilirim.

Ayrıca doktora çalıőmam süresince gösterdiği engin sabrından dolayı eőim Erhan Gökdağ'a sevgi ve saygılarımı sunarım

ÖZGEÇMİŞ

07.11.1968 yılında Karaman'da doğdum. İlk öğrenimimi Ankara Yalçın Eskiyanan İlkokulu'nda 1979 yılında tamamladım. Ortaokul ve liseyi Ankara Atatürk Anadolu Lisesinde okudum ve 1987'de mezun oldum. 1987 yılında girdiğim Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 1992'de bitirdim. 1992-1994 yılları arasında Urla Gelişim Vakfı Veteriner Polikliniği'ne büyükbaş veteriner hekimliği yaptım. Eşimin askerlik hizmeti nedeniyle bir yıl İskenderun'da kaldım. 1995 yılından bu güne kadar Urla-Vet Veteriner Polikliniğinde büyükbaş ve pet klinisyenliği yapıyorum. 2000-2002 yılları arasında İzmir Bölgesi Veteriner Hekimleri Odası'nda sayman olarak yönetim kurulu üyeliği yaptım. Mesleki olarak çeşitli derneklere faal üyeliğim devam etmekte olup, yurtiçi ve yurtdışında yapılan kurs, seminer ve kongrelere katılmaktayım. 2000 yılından bu yana Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde doktora öğrencisiyim. Evliyim ve bir oğlum var.