

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOÇ SPERMASININ FARKLI ORANLARDA SÜKROZ
İÇEREN SULANDIRICILAR İLE GLİSEROLLÜ VE
GLİSEROLSÜZ DONDURULMASI**

İlker YAVAŞ

DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Necmettin TEKİN

2008 – ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Dölerme ve Sun'ı Tohumlama Doktora Programı
Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/01/2008

Prof. Dr. Necmettin TEKİN

Prof. Dr. Rıfat VURAL

Prof. Dr. Ali DAŞKIN

Doç. Dr. Fikret KARACA

Doç. Dr. Ergun AKÇAY

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Şekiller ve Resimler	vi
Çizelgeler	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Koyunlarda Reprodüksiyon	1
1.2. Koyunlarda Seksüel Siklusun Hormonal Mekanizması	2
1.3. Koçlarda Reprodüksiyon	3
1.4. Koçlarda Spermatolojik Özellikler	8
1.5. Koyunlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama	13
1.6. Spermanın Saklanması	14
1.6.1. Spermanın Dondurularak (Uzun Süreli) Saklanması	15
1.7. Kryoprotektalar	17
1.7.1 İnternal Kryoprotektanlar	19
1.7.1.1. Gliserol	20
1.7.2. Eksternal Kryoprotektanlar	23
1.7.2.1. Makromoleküller	23
1.7.2.2. Sakkaritler	24
1.7.2.3. Sükroz	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1. Hayvan Materyali	27
2.2. Hayvanların Bakım ve Beslenmesi	27
2.3. Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi	27
2.3.1. Makroskobik Muayene	28
2.3.1.1. Spermanın Rengi ve Kıvamı	28
2.3.1.2. Spermanın Miktarı	28
2.3.1.3. Spermanın pH Değeri	28
2.3.2. Mikroskobik Muayene	31
2.3.2.1. Spermatozoa Motilitesi	31
2.3.2.2. Spermatozoa Yoğunluğu	31
2.3.2.3. Anormal Spermatozoa Oranı	31
2.3.2.4. Ölü Spermatozoa Oranı	32
2.4. Spermanın Sulandırılması ve Sulandırıcı Grupları	32
2.5. Spermanın Dondurulması	35
2.6. Spermanın Çözdürülmesi ve İn Vitro Değerlendirilmesi	35
2.6.1. Hypoozmotik Swelling Test (Host)	37
2.7. Bulguların Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz	37
3. BULGULAR	38
3.1. Nativ Sperma Parametreleri	38
3.2. Alışım (Equilibrasyon) Sonrası Sperma Parametreleri	38
3.3. Çözüm Sonu Spermatolojik Muayene Parametreleri	39

3.3.1. Motilite	39
3.3.2. Ölü Spermatozoa Oranı	40
3.3.3. Anormal Spermatozoa Oranı	40
3.3.4. Hypoozmotik Swelling Test (Host)	40
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
ÖZET	55
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	66

ÖNSÖZ

Dünya nüfusunun hızlı artışı, dengeli bir beslenme için büyük önem taşımakta olan temel besin maddelerinden hayvansal protein ihtiyacını da arttırmaktadır. Gelişmiş ülkelerde bu artan ihtiyacın karşılanmasına yönelik, hayvancılığın desteklenmesi, hayvan ıslahı ve birim başına verimin artması yönünde çalışmalar sürekli yapılmaktadır.

Ülkemizde, son yıllarda nüfusun hızlı artışına karşılık özellikle küçükbaş hayvan sayısı hızla azalmakta, buna bağlı olarak elde edilen hayvansal ürünler de azalmaktadır. Bu azalma ülkemizde önemli derecede hayvansal protein açığı doğurabilir. Ortaya çıkan tehlike birim hayvan başına daha fazla ürün almayı zorunlu kılmaktadır. Hayvanlarda ürün artışı ıslah çalışmaları ve döl veriminin artırılması ile sağlanabilecektir.

Koyun popülasyonumuzun ıslah edilmesi, dolayısıyla verimlerinin artırılması suni tohumlama ve embriyo transferi gibi biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması ile mümkün olabilecektir. Suni tohumlama hayvan türlerinde genetik ilerlemenin sağlanabilmesi amacıyla kullanılan en önemli ve basit yöntemdir. Çünkü, embriyo transferi ile bir dişiden üretilebilecek yavru sınırlıyken, iyi bir damızlık erkek hayvandan elde edilen sperma ile bir yılda on binlerce dişi tohumlanabilmektedir. Suni tohumlama çalışmalarının ekonomik olabilmesi spermanın muhafaza edilebilir ve istenilen yere götürülebilir olmasına bağlıdır. Bu da spermanın özellikle uzun süreli muhafazası ile sağlanabilir. Koç spermasının uzun süreli yani dondurularak saklanması ve çözüm sonu tohumlamalarda başarılı sonuçlar alınması henüz tam olarak gerçekleştirilemediği için konu güncelliğini korumakta ve yeni çalışmalar yapılmaya devam etmektedir. Sunulan çalışmada da koç spermasının uzun süreli saklanması farklı sulandırıcılar kullanılarak daha önce yapılan çalışmalara göre çözüm sonu daha iyi spermatolojik parametrelere ulaşılması arzu edilmiştir.

Doktora tez çalışmam süresince yardım ve desteklerinden dolayı danışmanım Prof. Dr. Necmettin Tekin'e, Anabilim Dalımız öğretim üyelerine, öğretim elemanlarına, idari personeline, çalışmamın istatistikî değerlendirmesinde katkıda bulunan Araş. Gör. Akın Yakan'a, saha çalışmalarında katkıda bulunan Araş. Gör. Ömer Varışlı'ya, laboratuvar çalışmalarında katkıda bulunan Dr. Zafer Cantekin'e, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, aileme, oğluma ve özellikle eşime şükranlarımı sunarım.

ŞEKİLLER ve RESİMLER

Şekiller

Şekil 1.1. Koyunlarda östrus siklusu süresince görülen hormonal değişiklikler.

Şekil 1.2. Koç genital organlarının şematik görünümü.

Şekil 1.3. Donma esnasında hücrede gelişen fiziksel olaylar.

Şekil 1.4. Hücrenin donması ve çözünmesi esnasında katyon kanallarında oluşan değişiklikler.

Şekil 3.1. Alışım sonrası motilite ortalamaları.

Şekil 3.2. Çözüm sonrası motilite ortalamaları.

Şekil 3.3. Çözüm sonrası ölü spermatazoa oranı ortalamaları.

Şekil 3.4. Çözüm sonrası anormal spermatazoa oranı ortalamaları.

Şekil 3.5. Çözüm sonrası host ortalamaları.

Resimler

Resim 2.1. Çalışmada kullanılan koçlar.

Resim 2.2. Sperma almada kullanılan gereçler.

Resim 2.3. Sperma alma işleminde kullanılan kızgın koyun.

Resim 2.4. Koçlardan suni vagen ile sperma alınması.

Resim 2.5. Sperma alındıktan sonra dereceli kadeh ile miktarın ölçümü.

Resim 2.6. Spermaların payetlere çekildikten sonra sıcaklığı ayarlanabilir araç termosu ile Anabilim Dalı Laboratuvarına taşınması.

Resim 2.7. Payetlerin otomatik dondurma makinesine yerleştirilmesi.

Resim 2.8. Otomatik dondurma makinesi.

ÇİZELGELER

Çizelgeler

Çizelge 3.1. Birleştirilmiş nativ koç spermalarında belirlenen spermatolojik parametreler.

Çizelge 3.2. Alışım sonrası spermatolojik parametreler.

Çizelge 3.3. Çözüm sonu spermatolojik parametreler.

1. GİRİŞ

Türkiye’de koyun yetiştiriciliği, hayvancılık sektörü içinde önemli bir paya sahiptir. Öyle ki, Türkiye’de yetiştirilen koyun sayısı, orantısal olarak toplam memeli hayvan sayısının yarısından fazlasını (%59) oluşturmaktadır (Tekin ve ark., 1991). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2005 yılı verilerine göre Türkiye’de yaklaşık 25,5 milyon baş koyun bulunmaktadır (Anonim, 2005). Ancak, hayvancılık sektörü içinde sayısal olarak önemli bir paya sahip koyunculuk verim açısından aynı düzeyde bulunmamaktadır. Bunun çeşitli nedenleri olmakla birlikte, henüz koç spermasının başarıyla dondurulamaması ve sığırlarda olduğu gibi rutin olarak dondurulmuş spermalarla suni tohumlamanın yapılamıyor olması da gösterilebilir (Tekin, 2000).

Koyun varlığımızın %97’si yerli ırklardan, %3’ü ise kültür ırkları ve melezlerden oluşmaktadır (Sakarya, 1998). Büyük çoğunluğu yerli ırklardan oluşan ve son yıllarda hızlı nüfus artışına karşılık sayıları hızla azalan koyunlarımızın ıslah edilmesi ve verimlerinin artırılması kaçınılmaz bir zorunluluktur. Bunun da başlıca yolu, yüksek verimli ve sağlıklı koçların spermalarını sulandırarak hacimlerini çoğaltmak, böylece bir koçtan tohumlanacak koyun sayısını arttırmaktır. Söz konusu uygulamalarda en geçerli yöntem koç spermasının dondurularak tohumlamada kullanılmasıdır. Söz konusu biyotekniğin Türkiye’de başarıyla uygulanabilmesi, koç spermasının dondurulmasında ve tohumlamada kullanıldıktan sonraki döl veriminde ortaya çıkan sorunların çözümlenmesine bağlıdır (Gökçen, 1983).

1.1. Koyunlarda Reprodüksiyon

Koyunlar mevsimsel poliöstrik hayvanlar olup, yer kürenin 35. kuzey paralelinin kuzeyinde ve 34. güney paralelinin güneyinde ki bölgelerde yaz sonu ve sonbahar başlangıcında üreme sezonuna girmektedirler. Bu paralellerin dışındaki bölgelerde (örneğin ekvator) gün uzunlukları fazla değişmediği için üreme sezonu tüm yıla yayılmakta ve bu faaliyetler ısı ve yağış gibi olaylardan etkilenmektedir (Kaya ve Çoyan, 1998).

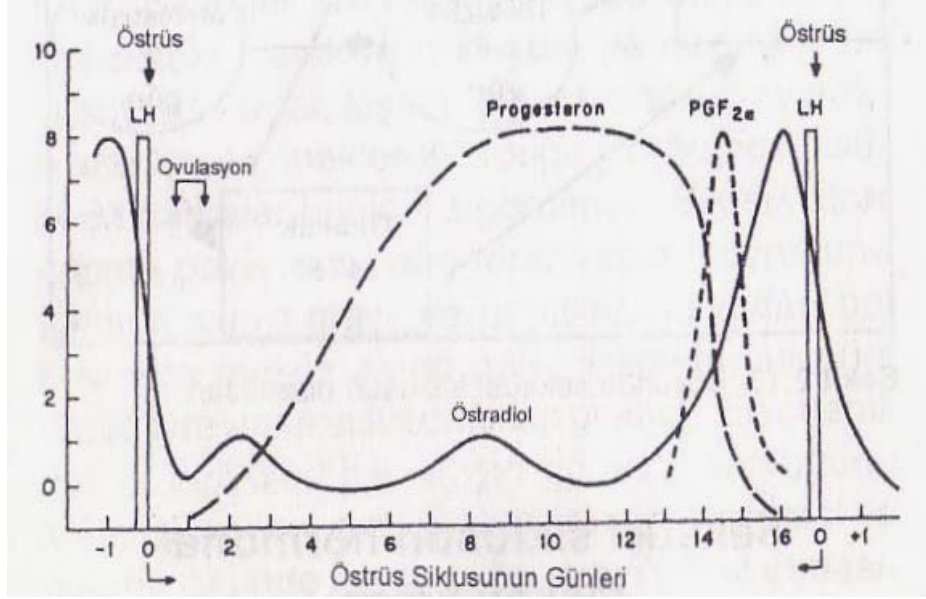
Koyunlar 6-9 aylıkken pubertasa, 9-15 aylık olduklarında da yetiştirme olgunluğuna erişirler. Koyunlarda pubertaya ulaşmada ergin vücut ağırlığına ulaşma, doğum ayı ve ırk çok önemlidir. Çünkü koyunlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olduklarından genital organlar gelişimini tamamlasada ilk kızgınlıklarını göstermek için uygun çevre koşullarını beklemek durumundadırlar (Alaçam, 1997). Yetiştirilen koyun ırkının erken veya geç gelişen ırk oluşuna göre ve kuzuların büyüme dönemindeki bakım-beslenmesine bağlı olarak ilk defa damızlıkta kullanma farklı yaşlarda olabilir. Geç gelişen ırklarda erkek ve dişi toklular 2.5 yaşında, et merinosu gibi erken gelişen ırklarda 1.5 yaşında, kaba-karışık yapağılı yerli ırklar 1.5 yaşında ilk defa damızlıkta kullanılmaya başlanabilir. İngiliz etçi koyunları gibi ırklarda kuzular büyüme döneminde iyi beslendikleri takdirde 7-12 aylıkken damızlığa alınabilmektedirler (Akçapınar, 1994). Koyunlarda östrus siklusu yaklaşık 16-17 gündür. Östrus süresi ise 26-36 (18-72) saattir. Bu süre ırk, yaş, coğrafi konum ve erkeklerle bulunma gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Çoyan, 2002).

1.2. Koyunlarda Seksüel Siklusun Hormonal Mekanizması

Gün uzunluğunun kısalmasına bağlı olarak artan melatonin koyunlarda GnRH salınımının artmasına neden olmaktadır. Mevsimsel değişiklikler ve çevresel faktörlerin hipotalamusu etkilemesiyle salgılanan GnRH'ın hipofiz ön lobunu etkileyerek FSH ve LH salınımını uyarması sonucu folliküler gelişme kontrol edilmektedir. FSH folliküler gelişmeyi uyarmakta, gelişen folliküllerden artan miktarlarda östrojen salgılanmaktadır. Östrojen seviyesi belli bir düzeye ulaştınca (10-20 pg/ml) LH salgısı uyarılmakta ve LH pikinden (70-80 ng/ml) 16-24 saat sonra ovulasyon şekillenmektedir. Follikül gelişimi sırasında östrojenin yanısıra inhibin de salgılanmaktadır, bu da FSH sekresyonunu inhibe ederek sekonder ve tersiyer follikül gelişimini sınırlamaktadır. Ovulasyondan sonra LH ve östradiol seviyeleri düşer. Kandaki düşük östrojen düzeyi GnRH salınımını baskılamaktadır. Ovulasyon sonrası gelişen korpus luteumdan salgılanan progesteron da gonodotropin salınımını ve foliküler gelişimi baskılamaktadır. Gebelik şekillenmediği takdirde siklusun 11-12. günlerinde uterus endometriyumundan salgılanan PGF_{2α} etkisiyle korpus luteum

küçülmeye ve progesteron seviyesi azalmaya başlar, kalkan negatif etkiye bağlı olarak gonodotropin salgısı artarak yeni bir folliküler gelişim uyarılır (Çoyan, 2002).

Koyunlar üreme sezonu içerisinde düzenli aralıklarla östrus gösterirler. Bu aralık gebe kalmayan koyunlarda yaklaşık 16-17 gündür. Genç hayvanlarda bu süre 1-2 gün daha kısa olabilmektedir (Çoyan, 2002).



Şekil 1.1. Koyunlarda östrus siklusunu boyunca görülen hormonal değişiklikler (Çoyan, 2002).

1.3. Koçlarda Reprodüksiyon

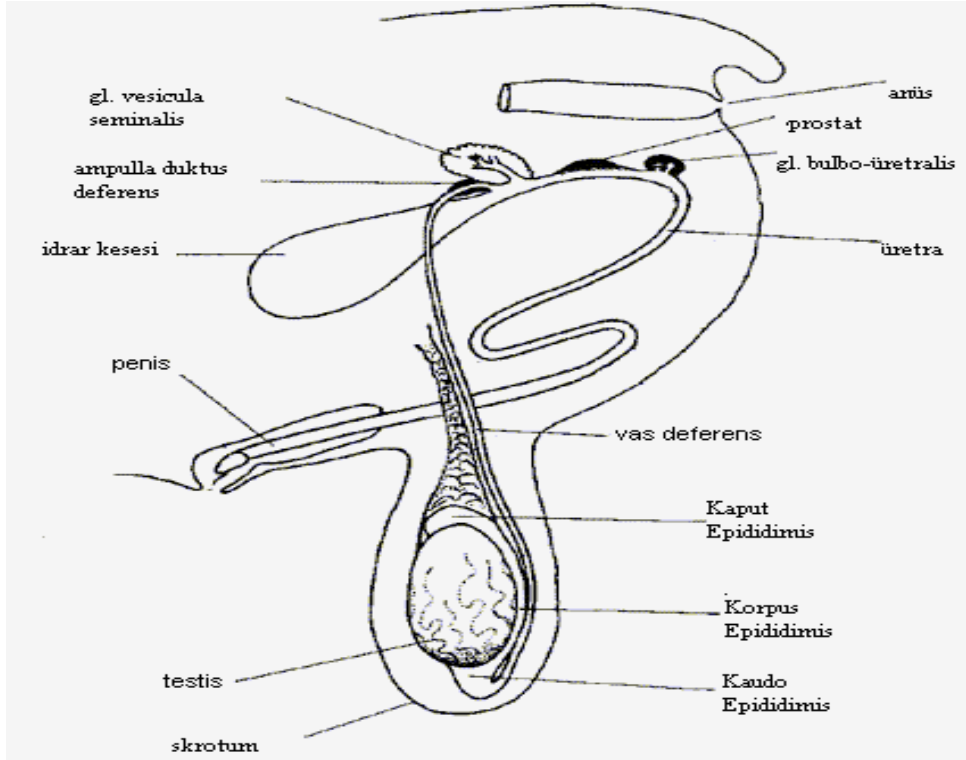
Koçlarda genital organların farklılaşması gebeliğin yaklaşık 35. günü civarında başlamakta ve testis ise fötüste 50 ile 60. günler civarında oluşmaktadır. Spermatogenezis doğumdan sonra yaklaşık 80 ile 90 günlükken başlamakta ve 140-150 günlük olduğunda ise spermatazoa ejakülatta görülebilmektedir (Kaymakçı ve Sönmez, 1992; Yarney ve ark., 1990).

Koçlarda üreme organları, primer seks organları, erkek eklenti bezleri, kanallar ve dış genital organlar olmak üzere 4 grup halinde değerlendirilebilir.

Testisler primer üreme organlarıdır (Hafez, 1987). Erkek kuzularda testisler doğumda skrotuma inmiş durumdadırlar (Yarney ve ark., 1990). Testisler spermatozoa üretimi ve hormon salgılanmasını sağlayarak üreme fonksiyon ve davranışlarını düzenlerler. Bu organlar, kıvrımlı kanalların bulunduğu kese tarzında organlardır. Bu kanallarda spermatogenezis gerçekleşir. Kanallar içerisinde spermatogenezisin devamlılığıyla birlikte, spermatogoniumdan tamamen gelişimini tamamlamış spermatozoonlara kadar her aşamada hücreler bulunur. Spermatozoon gelişimi bu kanalcıkların duvarında başlar ve gelişim boyunca kanal lumenine doğru ilerlemeye devam eder. Bu duvarlar arasındaki sertoli hücreleri spermatozoon gelişimi esnasında bu hücrelerin beslenmesini ve gelişimini desteklemektedirler. Kanal lumenine ulaşan spermatozoonlar sıvı basıncı etkisiyle kanal boyunca hareket ederek epididimise geçerler (Hafez, 1987). Erkek gonadları olan testislerin sperma üretme kapasitesi kalıtım yoluyla önceden belirlenip, koçun yaşamı boyunca yaş, hormonlar, beslenme, iklim ve mevsim gibi diğer faktörler tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar etkilerini ya hipofiz bezi yoluyla ya da direkt testisi etkileyerek göstermektedirler (Yarney ve ark., 1990). Çoğu memelilerde olduğu gibi koçlarda da testisler, skrotumda vücut ısısının birkaç derece altında tutulmaktadır. Bu düşük ısı spermatogenezisin devamı için gerekli görülmektedir. Kriptorşidli koçlarda testisler skrotuma inmemiş ya da kısa skrotumlu ise seminifer tubullerde dejenerasyon meydana gelerek spermatogenezis durmaktadır. Bu nedenlerle testis ölçümleri koç seçiminde ve androlojik muayenede önemli parametrelerdir (Evans ve Maxwell, 1987; Özkoca, 1984).

Koçlarda eklenti bezleri olarak vesikula seminalis, prostat ve bulbo üretral bezler bulunmaktadır. Tüm bezlerden salgılanan sıvılar (seminal plazma) spermatozoa ile birleşerek ejaküle edilen spermayı oluşturmaktadır. Bu sıvı ejakülat miktarında artış sağlayarak spermatozoonların dişi ve erkek üreme kanallarında hareket kabiliyetini artırır. Bununla birlikte seminal plazmanın fonksiyonları arasında; spermatozoonların beslenmesi ve korunması için bir kültür ortamının oluşturulması ve spermatozoonların dişi kanalda transportu için kontraksiyon sağlanması bulunmaktadır (Hafez, 1987). Koçlarda seminal plazma içeriği mevsime bağlı olarak değişim göstermektedir (Kumar ve ark., 1999). Seminal plazma ejaküle olmuş spermanın kalitesini belirlemede önemlidir. Seminal plazmanın kapsamlı çalışması,

daha iyi sulandırıcıların hazırlanmasını, daha sağlıklı şartlarda kısa ve uzun süreli saklanma koşullarının saptanması ve daha uygun saklama medyumlarının hazırlanmasını beraberinde getirecektir. Koç seminal plazmasında, vesikula seminaliste üretilen fruktoz ve prostaglandin oranı diğer birçok türe göre daha yüksektir (Knobil ve Neill, 1988).



Şekil 1.2. Koç genital organlarının şematik görünümü (Wilson, 1999).

Vesikula Seminalis, tubulo-alveolar bir yapıda olup, bir çifttir. Koçlarda dallı kanalcıklar sistemi içeren multiple loblarla düzenlenmiş kompakt glandular dokulardan oluşmaktadır. Koçlarda bu bezi palpe etmek mümkün değildir. Fruktoz ve sitrik asit önemli komponentleridir, ayrıca bu bez askorbik asit, inositol, fosfataz, ergotionin, enzimler, vitaminler, prostaglandinler, metabolitler, globulin ve fibrinojen de salgılar (Knobil ve Neill, 1988).

Kanallar testislerden sonra epididimis, deferent kanallar ve üretra ile devam etmektedir. Epididimis testis üzerinde bulunan ve spermatozoanın maturasyonunun gerçekleştiği kanallardan meydana gelir. Epididimiste maturasyona uğramayan

spermatozoa fertilizasyon yeteneğine sahip değildir. Bunun yanında epididimis spermatozoa depolanması görevini de gerçekleştirmektedir. Spermatozoanın normal olarak epididimisten göçü ortalama 13 gün sürmektedir (Hafez, 1987).

Deferent kanallar spermatozoanın epididimisten üretraya taşınmasında görev almaktadır. Erkek eklenti bezleri ürettiği sıvıları, deferent kanal ile üretra ile birleştikleri yerin yakınına akıtmaktadırlar. Üretra kanalı ise spermanın deferent kanaldan penisin ucuna kadar iletilmesini sağlamaktadır (Hafez, 1987).

Koçlarda eşeyssel olgunluk hem yaş hem de vücut ağırlığıyla ilişkili olmakta ve özellikle iklim ve beslenme olmak üzere çevresel faktörlerden etkilenmektedir (Kaymakçı ve Sönmez, 1992; Hafez, 1987). Belirli bir yaş dilimi arasında, ırklara göre değişmekle birlikte, ergin vücut ağırlığının %40 ile %60'ına ulaştığında eşeyssel olgunluk meydana gelmektedir. Erken gelişen koyun ırklarının geç gelişenlere oranla daha önce eşeyssel olgunluğa eriştiği gibi, melezlerin ana-babalarına oranla daha erken olgunlaşması, ırk etkisi olarak belirtilmektedir (Kaymakçı ve Sönmez, 1992).

Koçlarda reproduksiyonun hormonal mekanizmasında görev alan en önemli hormon melatonindir (Hafez, 1987). Hayvanlarda melatonin sekresyonu karanlığın başlaması ile aktive olmakta, ışık veya aydınlık karşısında aktivasyon sona ermektedir (Emre, 1993). Koçlarda spermatogenezis yıl boyu devam etmesine rağmen, gün ışığının azalmaya başlamasıyla birlikte seksüel aktivite önemli ölçüde artar. Gün ışığının azalması, epifizden (pineal bez) melatonin salgılanmasını artırır. Melatonin direkt olarak hipotalamusa etki ederek buradan gonodotropinlerin salgılanmasını stimule etmektedir. GnRH adenohipofizi etkileyerek buradan FSH ve LH salınımını uyarmaktadır. LH testisteki interstisiyel hücrelerden (leydig hücreleri) testosteron salgılanmasını sağlarken, FSH ise sertoli hücreleri ve germinal epitel üzerine etkili olmaktadır. Sertoli hücreleri bu etki altında ABP (androjen binding protein) ve inhibin hormonları salgılamaktadır. ABP, testosteronun tubulus seminiferuslar içine alınmasını ve buradaki konsantrasyonunun yükseltilmesi için görev yapar. Böylece spermatogenezis için gerekli olan testosteron tubuller içinde ve germinatif hücrelere alınmış olur. Hormon sekresyonu ve reproduktif faaliyetlerin

kontrolü hipotalamo-hipofizeal-testiküler aksis adı verilen bir mekanizma ile sağlanmaktadır (Hafez, 1987; Ak, 1996).

Feromon ve diğer kimi çevre faktörleri de hormon salınımında etkili olmaktadır. Bunun göstergesi olarak östrustaki koyunlarla birlikte tutulduğunda ve yoğun besleme ile koçların LH salınımı uyarılmaktadır (Gonzales ve ark., 1988).

Koçlarda seksüel davranışlar, hormonal aktivite, gametogenezis ve aynı zamanda testis ağırlığı ve hacminde mevsime bağlı olarak önemli değişimler gözlenir. Bununla birlikte, ortaya çıkan fizyolojik değişimler ve seksüel davranışlar koyunlardaki kadar belirgin değildir. Üreme mevsimi dışında dişilerde östrus ve ovulasyon duraklarken koçlarda spermatogenezis ve seksüel aktivite yıl boyu devam eder. Genel olarak, bahsedilen tüm bu parametreler yaz sonu ve sonbaharda yüksek, kış sonu ve ilkbaharda düşüktür (Rosa ve Bryant, 2003).

Koçların fotoperiyota olan duyarlılıkları koyunlardan farklıdır. Koçlarda seksüel aktivite koyunlardan bir buçuk ay önce başlar. Bu durum, koyunlarda siklik periyot başladığında koçların yüksek seksüel aktivitede olmasını sağlar. Bu olay oldukça önemlidir. Çünkü büyük çaplı foliküllerin varlığı nedeniyle anöstrusteki koyunlar hormonal stimulasyondan sonraki birkaç gün içerisinde ovulasyon gösterebilirken, koçlar spermatogenezisin tamamlanabilmesi için yaklaşık 45 güne ihtiyaç duyarlar (Rosa ve Bryant, 2003).

İyi bir damızlık koç, aşım mevsiminde sürü ile devamlı dolaştığında 25-50, ortalama 30 koyuna aşım yapabilir (Hafez ve Hafez, 2000). Koç birkaç saat sürünün içerisine bırakılır, sürü ile gezmez ise bu sayı 2 katına çıkabilir. Suni tohumlama kullanıldığında ise bu sayının çok daha üstüne çıkılır ve yüzlerce koyun tohumlanabilir (Özkoca, 1984).

Kaynaklarda erkek kuzuların ilk damızlıkta kullanılma yaşı, erken gelişen ırklarda 7-8 ay, geç gelişenler (bazı merinos türleri gibi) için 16-20 ay civarı olarak verilmektedir (Kaymakçı ve Sönmez, 1992; Hafez, 1987). Koçlarda spermatogenezis beslenme ve bakım şartlarına bağlı olarak ortalama 4. ayda başlamaktadır (Ak, 1996). Gürsoy ve ark. (1996), erken gelişen ırklarda spermanın 4-8 aylıkken

alınabildiğini ancak spermatozoa yoğunluğu ve motilitesi yönünden 7-8 aylıktan yeterli düzeye geldiğini kaydetmektedirler. Koçlar, damızlık olarak 9-16. aylarda kullanılabilirler. Bu aylarda ergin vücut ağırlığına erişilmiş ve genital organlar gelişmelerini tamamlamaktadırlar (Ak, 1996).

1.4. Koçlarda Spermatojik Özellikler

Koç spermasının ejakülat miktarı (hacmi), sperma alındıktan hemen sonra ya derecelendirilmiş sperma toplama kadehi ya da pipetle ölçülebilmektedir (Gökçen, 1990; Özkoca, 1984; Tekin, 1990). Özkoca (1984), bir koç ejakülatının 1 mililitreden (cm^3) biraz az olduğunu, Sevinç (1974), koç spermasının hacminin 0,5 – 2,0 mililitre arasında, ortalama 0,8 olduğunu bildirmektedir. Koçlarda sperma üretimi 18 aylıktan 4 yaşına kadar gittikçe artar, ortalama 1 mililitredir (Maxwell ve Salamon, 1993; Salamon ve Maxwell, 2000). Ejakülat miktarı yönünden koçlarda bireysel farklılık görülebildiği gibi ejakülatları arasında da farklılık görülebilmektedir (Trimberger, 1974). Genel olarak yaş, mevsim, beslenme, sperma alan kişinin teknik becerisi, yönetim, sperma alma yöntemi, sperma alma sıklığı, koçun mizacı ve kondüsyonuna bağlı olarak sperma miktarı değişebilmektedir (Evans ve Maxwell, 1987; Gökçen, 1990; Trimberger, 1974; Tekin ve ark., 1991).

Spermatojik özelliklerdeki mevsimsel değişiklikleri araştıran, Cupps ve ark. (1990), Suffolk ırkı koçlarda, Kasım ayı (sonbahar) 1,52 ml, Mart ayı (ilkbahar) 1,23 ml, Temmuz ayı (yaz) 1,09 ml miktarlarını en yüksek mevsimsel değerler olarak ölçmüşlerdir. Yaşın sperma miktarına etkisini araştıran, Walker ve ark. (1985), sperma miktarının beş aylık erkek kuzularda 0,40 – 0,45 ml, on beş aylık olanlarda 0,95 – 1,2 ml olarak ölçüldüğünü bildirmişlerdir. Al-Hakim ve ark. (1989), yaptıkları çalışmada ivesi koçlardan ilkbaharda 1,36 ml sperma elde etmişlerdir.

Çalışmalarında başlıca spermatojik özellikleri saptayan Tekin ve ark. (1991), Dağlıç, Ramlıç ve Merinos ırkı koçlarda 1,0 – 1,29 ml, Soylu ve ark. (1991), Dorset Down, Hampshire, Siyah baş Alman, Lincoln ve Border Leicester ırkı koçlarda sırasıyla 0,63; 0,68; 0,97; 0,90 ve 0,50 ml miktarlarda ejakülat elde etmişlerdir.

Sperma kıvamı, ejakülatın akışkanlığını ve viskozitesini göstermektedir. Sperma sulu kıvamdan, krem kıvamına kadar değişken viskosite göstermekte ve büyük ölçüde içerdiği spermatozoa sayısı ile ilgili olmaktadır (Tekin, 1990). Spermanın kıvamı yönünden muayene edilmesi ejakülattaki spermatozoa yoğunluğu hakkında bir fikir vermesi bakımından önem taşımaktadır. Evans ve Maxwell (1987), koç spermasının içerdiği spermatozoa sayısını hemositometrik yöntemle ölçerek, kıvam yönünden sınıflandırma yapmışlardır. Buna göre her ml spermanın içerdiği spermatozoa sayısı, koyu krem $5,0 \times 10^9$, krem $4,0 \times 10^9$, açık krem $3,0 \times 10^9$, süt görünümünde $2,0 \times 10^9$, bulanık $0,7 \times 10^9$ olmuştur. Özkoca (1984), iyi bir koç spermasının krema kıvamında olduğunu kaydetmektedir. Gökçen (1990), seminal plazma miktarının az, buna karşılık spermatozoa sayısının yüksek olmasından dolayı koç spermasında vizkozitenin düşük olduğunu belirtmektedir.

Spermatozoa motilitesi, bir yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz veya diğer hareket çeşidi gösterenlere oranı olarak tanımlanmakta ve motil spermatozoonların dölleme güçleri olduğu bilinmektedir (Tekin, 1990). Bunun için özellikle sun'i tohumlama çalışmalarında ve yetiştiricilikte erkek damızlıklardaki spermatozoa motilitesinin saptanmasının önemi büyüktür (Daşkın, 1991). Motil spermatozoonların spermadaki sayıları, toplam spermatozoa içindeki yüzde oranlarıyla hesaplanabilir (Tekin, 1990).

Spermatozoonların hareket biçimleri ve hızlarının hayvan türlerine göre değerlendirilmesi gerektiğini bildiren Tekin (1990), koç ve teke ejakülatlarında spermatozoa motilitesinin % 90 olduğunu belirtmektedir. Buna karşın yaptıkları çalışmalarında motilite oranını, Tekin ve ark. (1991), Merinos, Dağlıç ve Ramlıç ırklarında sırasıyla, % 84,78; % 75, 15 ve % 76, 17 olarak saptarken, Soylu ve ark. (1991), beş ayrı ırkta % 32,50 ile % 90 arasında motilite değerleri bildirmişlerdir.

Spermanın kullanılmasında ve değerlendirilmesinde ejakülat miktarı ve motilite yanında çok önemli bir spermatolojik özelliği oluşturan spermatozoon yoğunluğu, tohumlama dozunun ayarlanmasında ve spermanın sulandırılmasında çok büyük önem taşımaktadır (Gökçen, 1990; Özkoca, 1984; Sevinç, 1984; Tekin, 1990). Ejakülatta spermatozoa yoğunluğunu, Trimberger (1974) üç milyar olarak vermesine

karşın, Evans ve Maxwell (1987), iyi kalitede bir koç spermasında $3,5 - 6,0 \times 10^9 / \text{ml}$ spermatazoa olması gerektiğini bildirmişlerdir. Koçlarda spermatozoa yoğunluğunun mevsimsel olarak değiştiğini kaydeden Cupps ve ark. (1990), koçlarda spermatozoa konsantrasyonunun Ekim ve Kasım aylarında, $3,37 \times 10^9 / \text{ml}$ ve $3,64 \times 10^9 / \text{ml}$, Mart ve Nisan aylarında $3,36 \times 10^9 / \text{ml}$ ve $3,09 \times 10^9 / \text{ml}$, Temmuz ve Ağustos aylarında, $2,44 \times 10^9 / \text{ml}$ ve $1,94 \times 10^9 / \text{ml}$, Eylül ayında ise $1,83 \times 10^9 / \text{ml}$ olarak elde etmişlerdir.

Özkoca (1984), yoğunluğu yüksek olan spermaların hafif asit, düşük olanların ise alkali reaksiyon verdiğini ve alkali özellikte olan spermaların genellikle kalite bakımından yetersiz oldukları gibi, döllenme yeteneklerinin de zayıf olduğunu bildirmiştir.

Spermada saptanan pH değeri değişimleri, spermaya dışarıdan herhangi bir maddenin karıştığını (Tekin, 1990), ya da ek cinsel bezlerin fonksiyonlarında bozukluk oluştuğunu göstermektedir (Gökçen, 1990; Tekin, 1990). pH değerinin belirlenmesi bu yönlerden önem taşımaktadır. Ayrıca bilimsel çalışmalarda ve spermanın değişik amaçlı kullanımlarında, spermatozoon metabolizmasına bağlı olarak belirli bir süre içinde pH değerinin değişmesi kriter olarak kullanılabilirliğinden, farklı mevsimlerde, değişik yaş ve ırktaki koçların sperma pH sınırının bilinmesi gerekli olmaktadır (Tekin, 1990).

Ölü spermatozoon oranını saptanması spermatolojik özellikler bakımından ancak tamamlayıcı bilgi vermektedir. Eğer, ölü spermatozoa oranı düşükse bu çok şey ifade etmez. Çünkü yerinde sallanan, çember hareket gösteren spermatozoonlar da canlı spermatozoon özelliği gösterebilirler. Spermada yüksek bulunan ölü spermatozoon oranı ise olumsuzluk işaretidir. Bu durumda diğer spermatolojik özellikler tekrar gözden geçirilmelidir. Ancak özellikle boyama yöntemlerinde hatalar oluşabileceği, boyama sonrası froti çekme sırasında ve frotinin kurutulması esnasında dikkatli olunmaması halinde ölü spermatozoa oranının artabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Spermada genellikle % 25'in üzerinde ölü spermatozoa bulunması istenmeyen bir özelliktir (Tekin, 1990).

Anormal yapılı spermatozoonların fertilizasyon güçlerinin olmaması ve kimi kalıtsal kusurları taşıması bakımından, spermatozoon morfolojisinin önemli olduğu ileri sürülmektedir (Tekin, 1990). Benzer şekilde Evans ve Maxwell (1987), spermatozoonun morfolojik muayenesinin sperma kalitesi yönünden ayrıntılı bir test olduğunu ve anormal spermatozoa oranının yüksek olması durumunda, fertilité düşüklüğüne yol açabileceği, bu nedenle %15 ten fazla anormal spermatozoa içeren spermaların suni tohumlamada kullanılmaması gerektiğini bildirmektedirler.

Isı ve ışıktaki mevsimsel değişikliklerle, koç spermalarındaki değişikliğin birlikte seyrettiğini ileri süren, Cupps ve ark. (1990), Ağustos ayında anormal spermatozoa oranının % 26 ile en yüksek, Ekim ayında % 3 ile en düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Wiemer ve Ruttle (1987), tüm yaş gruplarında motilitenin anormal spermatozoa oranı ile negatif ilişkili olduğunu, ergin ve yaşlı koçlarda büyük testisli olanlarda, küçük testisli olanlara göre anormal spermatozoa oranının yüksek olduğunu bildirmektedirler.

Pratik olarak konsantrasyonu $1,0 \times 10^9$ / ml'den az olan, motilitesi % 60'dan daha düşük ve anormal spermatozoa oranı % 30'dan fazla olan koç sperması sun'i tohumlamada kullanılamaz. Bununla birlikte bir koçun fertilité bakımından yetersiz olduğu sonucuna varmadan önce, değişik ejakülatları 1-2 hafta süre ile incelenmelidir. Çünkü bazı koçların spermalarının, koçların kullanılmasıyla düzeldiği, bazılarının ise tamamen bozulduğu bildirilmektedir (Özkoca, 1984).

Koç spermasının spermatolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine çeşitli araştırmalar yapılmış ve değişik sonuçlar elde edilmiştir. Tekin ve ark. (1991), yaptıkları bir çalışmada Merinos ırkı koçlarda başlıca spermatolojik özelliklerinden ortalama sperma miktarını 1,0 ml, spermatozoa motilitelerini % 84,8, spermatozoa yoğunluğunu $3,5 \times 10^9$ / ml ve anormal spermatozoa oranını ise % 3,5 olarak bulmuşlardır. Gökçen (1977) ise, Merinos ırkı koçlarda aynı spermatolojik özellikleri sırasıyla 1,48 m, % 80,4, $3,0 \times 10^9$ / ml ve % 3,88 olarak bildirmiştir.

Uysal ve arkadaşları (2000), farklı sulandırıcılarla dondurulmuş koç spermalarından elde edilen döl verimi üzerine yaptıkları bir araştırmada, koçların

nativ spermalarında ortalama sperma miktarını 1,04 ml, spermatozoa motilitesini %76,5, spermatozoa yoğunluğunu $2,6 \times 10^9$ / ml, anormal spermatozoa oranını % 11,7, ölü spermatozoa oranını % 9,6 ve spermanın ortalama pH değerini ise 6,75 olarak tespit etmişlerdir.

Yoğunluk morfoloji ve motilite gibi standart sperma değerlendirme testleri fertilité hakkında bir fikir vermektedir. Ancak spermatozoonun fizyolojik bütünlüğünün bir göstergesi olan hücrenin hareket şekli, spermanın dışı kanalda ilerleme gücü ve hücrenin donma yeteneği gibi testler mutlaka dikkate alınmalıdır. Spermanın potansiyel fertilitésini belirlemeye yönelik çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Ne var ki düzenli kontrollerin yapılamaması, spermanın mikrobik kontaminasyonunun önüne geçilememesi ve teknik imkansızlıktan ileri gelen bir çok nedenler testlerin hatalı pozitif veya hatalı negatif sonuç vermesine neden olabilmektedir. Genelde spermanın potansiyel dölleme gücünün belirlenmesi amacıyla Zona-Free Hamster Ova Testi ve Hipoozmotik Swelling Test kullanılmaktadır (Hafez, 1993).

Hipoozmotik swelling test (host) spermatozoon membranının ve fonksiyonel kuyruk membranının değerlendirmesi için geliştirilen özel bir testtir (Ducci ve ark., 2002, Buckett ve ark., 1997). Buckett ve ark. (1997), yaptıkları çalışmada host skorunun fonksiyonel olarak sağlam membrana sahip spermatozoonların oranını gösterdiğini bildirmişlerdir. Hücre plazma membranının hipoozmotik ortama maruz bırakılması halinde ozmotik basınçlar eşitleninceye kadar su hücre içine girer. Bu su girişinden dolayı hücrenin hacmi ve hücre zarı hacmen büyür ve bunun sonucunda plazma mebranında şişlikler oluşur. Spermatozoon kuyruğunun fibril kısmını kaplayan hücre zarı, baş kısmına göre daha gevşektir. Bu nedenden dolayı kuyruk kısmı diğer bölgelere göre daha bariz şekilde şişer. Kıvrılma plazma membranının şişmesinden ileri gelir. Düşük ozmotik basınca sahip ortamlarda kimyasal ve fiziksel yönden sağlam spermatozoonun kuyruk kısmında şişmeler oluşurken, sağlam olmayan hücrelerde bu reaksiyonlar görülmez (Ahmadı ve Soon-Chye, 1992).

Correa ve ark. (1997), host için 5 dakika inkubasyon süresinin yeterli olduğunu, diğer bazı araştırmacıların belirttiği gibi 1 saat inkubasyona gerek olmadığını, zaten

sperma hücre membranının şişme ve kıvrılmasının yaklaşık bir dakikada tamamlandığını bildirmişlerdir.

Boğa spermasında in-vitro fertilizasyon yeteneği ile host arasındaki ilişkiyi inceleyen Rota ve ark. (2000) eritme ve kapasitasyon sonrası spermayı 5 dakika 100 mOsmol fruktoz/sodyum sitrat host medyumuyla inkube etmişler, ışık mikroskopunda 200 hücre sayarak test sonucunu değerlendiren araştırmacılar, host'ın tek başına sperma kalitesi hakkında yeterli bir fikir verebileceğini bildirmişlerdir.

Söderquist ve ark. (1997), koç spermasında farklı çözündürme prosedürleri kullanarak yaptıkları çalışmada 100 mOsmol host medyumunun dondurulmuş-çözdürülmüş koç sperması için uygun olduğunu bildirmişlerdir.

1.5. Koyunlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama

Koyunlarda sun'i tohumlama Fransa ve İspanya gibi özellikle koyun sütünden yoğun olarak peynir üretilen ülkeler ile, Avustralya, Yeni Zellanda gibi büyük çapta koyun yetiştiriciliği yapılan ülkelerde büyük önem kazanmıştır. Türkiye'de ise oldukça sınırlı olarak yapılmaktadır (Koşum ve Wassmuth, 2000).

Koyunlarda sun'i tohumlama üzerine ilk çalışmalar 1899 yılında Veteriner Hekim E.I. Ivanof tarafından Rusya'da başlatılmıştır (Özkoca, 1984). Daha sonraki yıllarda koyun sun'i tohumlama çalışmaları Avrupa ülkelerine geçmiştir (Tekin ve ark., 2006). Türkiye'de ise Prof. Dr. I. Mihailof öncülüğünde 1926 yılında yurtdışından getirilen Merinos koçlarla başlamıştır (Çetinkaya, 1984; İleri, 1994). Ülkemizde suni tohumlama uygulanan koyunların sayısı giderek artmış ve 1970 yılında en yüksek sayıya ulaşmıştır. Ancak bu yıldan sonra yapağı fiyatlarının düşmesi nedeniyle tohumlanan koyun sayısında önemli bir azalma olmuştur (Soylu, 1988).

Koyunlarda sun'i tohumlamanın yararları şu şekilde özetlenebilir (İleri, 1994):

- 1) Kızgınlığa gelen dişileri kontrol edebilmek.

- 2) Koçların spermatolojik özelliklerini inceleyerek potansiyel fertiliteleri hakkında sağlıklı bilgi edinebilmek.
- 3) Değerli damızlık koçlardan daha fazla yararlanabilmek.
- 4) Fazla sayıdaki koçları gereksiz yere besleme külfetinden kurtulmak.
- 5) Az sayıdaki erkek damızlıkların sağlığı ile daha yakından ilgilenebilmek.
- 6) Sperma sulandırıcılarına antibiyotik katarak bakteriyel kontaminasyonu kontrol altına alabilmek.
- 7) Her dişinin ayrı ayrı tohumlandığından emin olmak.
- 8) Hayvan ıslahına yönelik farklı koyun ırklarının doğal olarak çiftleştirilmesi her zaman mümkün değildir. Böyle durumlarda sun'i tohumlama tekniğinden yararlanılır.
- 9) Yetiştirme hijyenini sağlamak, çiftleşmeyle geçen hastalıkları önlemek.
- 10) Bilimsel çalışmalar.

Koyunlarda günümüze kadar yapılan başlıca tohumlama yöntemleri; vajinal, servikal, transservikal intrauterin, laparotomik intrauterin, laparoskopik intraoviduktal, laparoskopik intrauterin olarak sayılabilir (Ataman ve Çoyan, 1996). Koyunlarda vajinal, servikal, transservikal intrauterin tohumlamalarda kullanılan sperma hacmi 0,05-0,2 ml dir. Tohumlama dozunda en az 50 milyon spermatazoon bulunmalıdır. Koyunlarda östrus ortalama 20-36 saat sürmekte ve ovulasyon 25-30. saatler arasında olmaktadır. Koyunlarda östrusun ilk 12-24 saati arasında yapılan tohumlamalardan başarılı gebelik oranları elde edilmektedir. Östrusu uzun süren koyunlarda aynı östrus evresinde 2. tohumlamanın yapılması tavsiye edilmektedir. Tohumlanan koyunların kayıtları tutularak 16-17 gün sonra tekrar östrus muayenesi yaparak, östrus tespiti halinde tekrar tohumlama yapılmalıdır (Hafez ve Hafez, 2000).

1.6. Spermanın Saklanması

Spermanın saklanması temel yaklaşım spermatozoonların metabolizmasını yavaşlatmak ve hareket enerjilerini azaltarak fertil ömürlerini uzatmaktır. Yapılan araştırmalar sonucunda spermanın saklanması için iki yöntem geliştirilmiştir.

Bunlardan ilki spermatozoanın ısını düşürerek veya metabolizmasını yavaşlatarak sıvı şekilde kısa süreli saklama, bir diğeri ise, 0°C'den daha düşük ısılarda dondurularak yapılan uzun süreli saklama yöntemidir (Ak, 1996).

İtalyan fizyolog Spallanzani (1784) tarafından memeli spermatozoasının saklanması ilişkin ilk adım atılmış ve ilk başarılı suni tohumlama gerçekleştirilmiştir (Maxwell ve Salamon, 1993). Spallanzani'nin bu buluşu, spermanın dondurulması sürecinin başlangıcı olarak nitelendirilebilir (Gökçen, 1983). Spallanzani ayrıca, erkek bir köpekten aldığı spermayı dişi köpeğe nakletmiş ve yavru elde etmiştir (Foote, 2002).

1.6.1. Spermanın Dondurularak (Uzun Süreli) Saklanması

Sperma dondurma teknolojisi, 1949 yılında Christopher Polge ve arkadaşlarının gliserolün spermatozoonlar üzerine kryoprotektan etkisini tesadüfen keşfetmeleri ile büyük bir ivme kazanmış, böylece spermanın uzun süreli saklanması gerçeklik haline gelmiş ve son 50 yıl içinde çok gelişmiştir (Holt, 2000; Foote, 2002; Vinha ve Coubrough, 1972).

Spermatozoonları soğuk şokunun etkisinden koruyan kryoprotektanların, uygun sulandırıcıların ve dondurma yöntemlerinin geliştirilmesi ile birçok hayvan türüne ait sperma başarıyla dondurulabilmiştir (Gökçen, 1983; Nur ve Ak, 2003).

Spermanın başlıca dondurulma yöntemleri ise şunlardır (Ak, 1996):

- 1) Ampul yöntemi : Kuru buz ve etil alkol kullanılarak cam veya plastik ampullerde dondurma yöntemidir.
- 2) Pellet Yöntemi : -79°C'deki kuru buz diskleri üzerine ufak oyuklar açılarak yapılır. Bu çukurlara 0,1 ml kadar sperma damlatılarak dondurulur.
- 3) Mini-Tüp Tekniği : Mini-Tüpler içinde sıvı azot buharında dondurulan spermalar sıvı azotta saklanmaktadır.
- 4) Payet yöntemi (Paillette, straw) : Günümüzde kullanılan en yaygın ve pratik dondurma yöntemidir. Sperma 0,25 veya 0,5 ml hacimli payet denilen plastik çubuklara çekilip ağzı kapatılarak sıvı azot buharında dondurulup sıvı azotta

saklanmaktadır. Payet yöntemi Mini-Tüp'e göre günümüzde daha yaygın bir kullanım alanı bulmuştur.

Günümüzde birçok evcil hayvanın spermalarının dondurulması ve dondurulmuş spermayla elde edilen dölverimi memnunluk verici düzeye erişmiş bulunmaktadır. Birkaç hayvan türünde ise henüz bu sonuçlara erişilememiştir. Ürünleri nedeniyle ekonomik önemi büyük olan koyun, bunlar arasında yer alır (Tekin ve Günzel, 1986). Koç spermasının soğutulması, dondurulması ve payetlenmesi esnasında motil spermatozoa oranı önemli ölçüde düşmektedir (Taşdemir ve ark., 2003). Ancak, koç spermasının başarıyla dondurulması için yapılan araştırmalar, sağlayacağı büyük yararları nedeniyle yoğunluğunu ve güncelliğini korumaktadır (Tekin ve Günzel, 1986).

Birçok araştırmacı tarafından koç spermasının dondurulmasına ilişkin ilk çalışmanın, Emmens ve Blackshaw'ın 1950'de yaptığı araştırma olduğu kabul edilmektedir (Gökçen, 1985; Gökçen ve ark., 2000; Soylu, 1988; Tekin ve Günzel, 1986). Bu çalışmada -79°C de ampulde dondurdukları koç spermalarında en iyi motiliteyi, sulandırıcıya % 7,5 – 10 Gliserin ve % 12,5 Arabinoz, Ramnoz veya Ksiloz katmakla elde ettiklerini bildirmişlerdir (Tekin ve Günzel, 1986).

Daha sonraki yıllarda yapılan çok sayıda araştırmadan elde edilen sonuçlar da normal döl verimi elde etmekten uzak ve çok değişken olmuştur (Tekin ve Günzel, 1986). Smirnov (1951) dondurulmuş koç sperması ile yaptığı tohumlamalarda % 42, Graca (1955) % 31,2, Emmens ve Blackshaw (1955) % 5, Kutnetsov (1956) yaptığı iki çalışmada % 19,3 ve % 33,5, Kalev ve Venkov (1961) % 55, Lopatko (1962) % 67 gebelik oranı elde ettiğini bildirmiştir (First ve ark., 1961; Salamon, 1967). Bu durum araştırmacıları çalışmalarında in-vivo olduğu kadar in-vitro değerlendirme yöntemlerini kullanmaya yöneltmiştir. Özellikle çözüm sonrası değerlendirmelerde, spermatolojik özelliklerden motilite ve akrozom morfolojisi dölleme sırasındaki önemleri nedeniyle üzerinde en çok durulan konular olmuştur (Tekin ve Günzel, 1986).

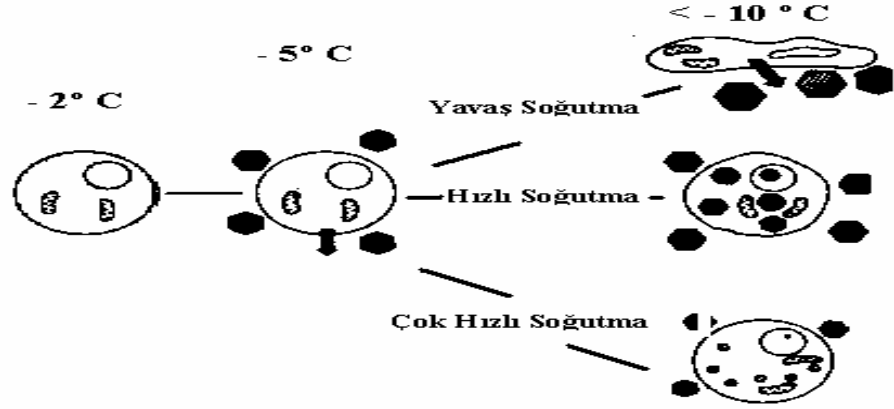
1.7. Kryoprotektanlar

Spermanın dölleme gücünü yitirmeden uzun süre saklanabilmesi ancak dondurulması ile mümkündür. Sperma dondurulurken meydana gelen ani sıcaklık değişiklikleri spermatozoonlara kalıcı hasarlar verebilmektedir. Spermatozoonların sıcaklığı sıvı azot içerisinde -196°C 'ye ulaşınca, vizkozitelerinin yüksek olması nedeniyle soğuk şoku oluşmamaktadır. Sadece foto-fizikal etkiler yani iyonize ve kozmik ışınların etkisi sonucu -196°C 'de makro moleküllerin parçalanması söz konusudur. Toprakta gelen ışın şiddetinin çok düşük olması ($0,1 \text{ rad/yıl}$) nedeniyle spermatozoonlar üzerine bu ışınların zararlı etkisinin ancak 2000 – 4000 yıllık beklemeden sonra oluşabileceği hesaplanmıştır (Çoyan, 2002).

Spermanın dondurulması ve çözündürülmesi esnasında değişen sıcaklık nedeniyle ortamda oluşan farklı ozmotik basınç ve kimyasal bileşimde oluşan değişikliklere karşı spermatozoonları koruyan maddelere Kryoprotektif Maddeler (kryoprotektan) denir (İleri, 1994) (Şekil 1.3.).

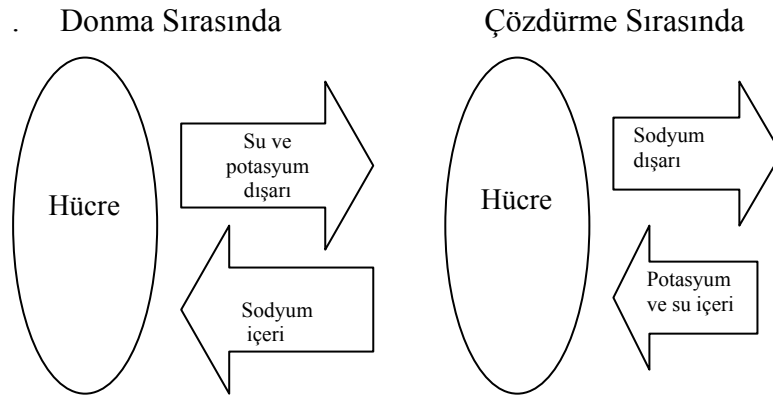
Spermatozoayı dondurmada ilk çalışmaların 1949 yılında Christopher Polge, Audrey Smith ve Alan Parkes'den oluşan ekibin gliserolün kryoprotektif etkisini keşfinden sonra başladığı kabul edilmektedir (Leibo ve Brandley, 1999).

Kryoprotektan olarak adlandırılan bileşiklerin genel özellikleri; düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları, belirli oranlarda kullanıldıklarında toksik olmamalarıdır. Kryoprotektif bileşikler genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu atırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak gösterirler. Hücre dondurulmadan önce kryoprotektanlarla inkubasyona tabi tutularak, intraselüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Bu bileşiklerin koruyucu etkileri, permeabilite farklılıkları ve toksitesi; hayvan türüne, hücre farklılıklarına, embriyoda ise farklı gelişim aşamasında kullanılmalarına göre değişebilmektedir (Jackson ve ark., 1997; Bucak ve Tekin, 2007).



Şekil 1.3. Donma esnasında hücrede gelişen fiziksel olaylar (Mazur, 1996).

Dondurma işleminde spermatozoonların zarar görmemesi için, sıcaklık yavaş yavaş düşürülmelidir. Çünkü ısı yavaş düşürüldüğü takdirde hücre içerisinde bulunan su dışarı çıkabilmekte (eksozmoz), hücre içerisinde çözülen maddelerin konsantrasyonu artmakta ve hücre içi ile hücre dışı su dengesi sağlanmaktadır. Sonuçta hücrede dehidrasyon şekillenmekte ve intrasellüler donma görülmektedir. Donma işlemi hızlı yapıldığı takdirde yeterli miktarda su hücre dışına çıkamaz. Bunun nedeni ise ekstrasellüler sıvıda konsantrasyonunun hızlı bir şekilde artmasıdır. Hücre dışına çıkamayan su hücre içerisinde buz kristallerinin oluşmasına neden olur (Çoyan, 2002) (Şekil 1.3.).



Şekil 1.4. Hücrenin donması ve çözünmesi esnasında katyon kanallarında oluşan değişiklikler (Bucak, 2003).

Koç ve boğa spermatozoasının docosahehexaenoic asit içeriğine, domuza göre yüksek oranda sahip olması, soğuk şokuna karşı direnç göstermede ve dondurmada daha iyi sonuç vermektedir (Leibo ve Songsasen, 2002).

Hücrenin donması esnasında, hücre dışında gelişen kar taneleri tarzındaki kristal oluşumlar, beraberinde eksternal tuz bileşiklerinin donmamış kısımlarda daha da konsantre hale gelmesine neden olur. Aynı zamanda hücre su kaybeder. Ekstraselüler ortam tuz yoğunluğu gibi, intraselüler tuz yoğunluğu da artar. Ekstraselüler ve intraselüler tuz yoğunluğu kritik seviyeye gelince (oda sıcaklığında 0,8 M), hücre plazma membranındaki katyon kanalları açılarak, yıkılan potasyum-klor köprüsünden potasyum hücre dışına çıkar. Ortamdaki sodyum ise yoğunluğun fazla olduğu hücre içine doğru yönelir. Çözüm sırasında da plazma membranındaki katyon kanalları kapanır, interselüler tuz yoğunluğu düşerken, hücre içinde proteinlerle bağlı haldeki potasyum-klor köprüleri yeniden oluşur. Bu durum hücre içine suyu geri çeker ve hücre yine ozmotik hacimde şişer (Mazur, 1996) (Şekil 1.4.).

Ekstraselüler kristal oluşumuyla gelişen hücre hasarı, olasılıkla kristalin morfolojisine de bağlıdır. Kristalin morfolojisi ise de onun büyüme hızının kontrol altına alınmasıyla düzenlenebilir. Ayrıca kryoprotektanların, ortamdaki kristal dentritlerinin oluşumunda etkileri vardır. Donma esnasında gelişecek olası bir intraselüler kristal oluşumundan sakınmak için, hücre yüzey bölgesinin hacmine oranının düşük olması gerekmektedir (Watson, 2000).

Kryoprotektanlar, internal (hücre içine girebilen) ve eksternal (hücre içine giremeyenler) olarak ikiye ayrılabilirler.

1.7.1. İnternal Kryoprotektanlar

İnternal kryoprotektanlar, hücre sitoplazmasından geçebilme özelliğine sahiptirler. İnternal kryoprotektanların başlıcaları, gliserol, methanol, etilen glikol, propylene glikol, asetamid, adenitol, perseitol, metil formamide, dimetil formamide, DMSO'dur (Gao ve Crister, 2000).

Permeabl özelliğe sahip ve düşük moleküler ağırlıklı internal kryoprotektanlar genelde hacim/hacim (v/v) oranında dondurma solüsyonlarına katılırlar. Bu tür kryoprotektanlar etkilerini su bağlayıcı olarak göstererek hücreleri donma zararından korurlar. Koruyucu etkileri, donma esnasında elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip, protein yapılarını korumaları ve düşük ısıların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları yönüyledir. Bu kryoprotektanların bir diğer işlevi ise, içine katılmış oldukları solüsyonun mekanik özelliklerini değiştirmeleridir. Vizkozitesi artan solüsyon, eriyiklerin kristalizasyonunu engeller (Gao ve Crister, 2000; Gomes ve ark., 2002; Maria ve ark., 2006).

1.7.1.1. Gliserol

Gliserol'ün kimyasal adı, Propantiriol -1, 2, 3'dür. Eczacılıkta kullanılan biçimine tıbbi gliserin adı verilen gliserol, hafifçe tatlı, zehirleyici olmayan bir sıvıdır. Su ve alkolle karışır; asetonda çözünür. Yağlı maddelerin sabunlaştırılmasıyla elde edilen gliserol, bir trihidrik alkoldür; yani herbiri farklı bir karbon atomuna bağlı üç hidroksil grubu (OH) içerir (Altınışık, 2005).



Şekil 1.5. Gliserol'ün 2 ve 3 Boyutlu Kimyasal Formülü ($C_3H_8O_3$) (Adams, 1994).

Gliserol yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir poliol bileşiğidir. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması onun spermatozon üzerine olan etkisini arttırmaktadır. Gliserol spermatozon membran lipidleriyle etkileşime girerek, kimyasal ve fiziksel streslere karşı membranları stabilize eder.

Gliserolün koruma mekanizması ile ilgili bazı görüşler şöyledir (Katkov ve ark., 1998):

- Membranlara önemli ölçüde hidrostatik basınç uygulayarak koruma sağlar.

- Elektroporasyon ile membranlarda oluşan hasara karşı koyar.
- Plazma membranına esneklik sağlayarak ozmotik strese karşı koyma yeteneğini artırır.
- Membranları stabilize eder.
- Membran füzyonunu indükler.
- % 6 oranında sulandırıcıda gliserolün varlığı, membran Lp değerini düşürür ve membranlardaki sıvı ve kryoprotektan giriş çıkışını dengeye getirerek, plazma membranında strese yol olacak ani hacim değişimlerini önler.
- Sulandırıcıdaki şeker bileşiklerinin membranlardaki polar baş yapılarıyla etkileşime girmesi, kendisinin daha yavaş salınımına yol açarak membran stabilizasyonunu oluşturur.

Gliserol, koç spermasının dondurulmasında sulandırıcılara koruyucu madde olarak en sık katılan maddedir (Salamon ve Maxwell, 2000). Gliserol uzun yıllardan beri kryoprotektan olarak kullanılmasına rağmen kanatlı suni tohumlamasında ve koyunların servikal tohumlanmalarında fertilité oranlarını düşürmektedir (Abdelhakeam ve ark., 1991a). Gliserolün zararlı etkileri değişik araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur. Colas (1975) gliserolün koç sperması için bir ölçüde toksik olduğunu ve 0° C ye yakın sıcaklıkta eklenmesinin zararlı etkilerini azaltabileceğini bildirmiştir. Sperma kryopreservasyonundaki yararlı etkilerine rağmen gliserol, spermatazonun membran yapısını değiştirmekte, bağlayıcı protein ve glikoproteinleri etkilemektedir. Ayrıca gliserol spermatazonların biyoenerjik ihtiyaçlarını arttırmaktadır (Hammerstedt ve ark., 1990).

Gliserolün toksik etkisi ile ilgili bir teoride, metabolik dönüşüm esnasında ortaya çıkan metabolit ürünlerin zararlı etki meydana getirdiğidir. Bu açığa çıkan metabolit kanatlı ve memeli spermasında methilglyosal'dır. Fakat nasıl toksik etki yaptığı hala tam olarak açık değildir (Katkov ve ark., 1998).

Gliserol toksisitesi, protein denatürasyonuna, proteinden yoksun kabarcıklara, aktin yapılarında değişimlere, tubulin polimerizasyonuna yol açarak hücre membran ve yapısında biyoenerjik denge üzerinde değişikliklere neden olur (Alvarenga ve ark., 2000).

Watson ve Martin (1975), gliserolün koç spermasında çözüm sonu akrozom hasarını önemli ölçüde arttırdığını ve gliserol miktarı arttıkça akrozom bozukluklarının derecesinin arttığını bildirmiştir.

Sönmez ve Demirci (2004), farklı oranda gliserol kattıkları sulandırıcılar ile koç spermasında yaptıkları çalışmada % 0 gliserol kattıkları grupta alışım (equilibrasyon) sonrası motilite oranını % 78,25, aynı grupta hasarlı akrozom oranını % 2,91, % 1 gliserol içeren grupta alışım sonrası motilite oranını % 76,45, hasarlı akrozom oranını % 3,14, % 3 gliserol içeren grupta alışım sonrası motilite oranını % 74,95, hasarlı akrozom oranını % 5,94, % 5 gliserol içeren grupta alışım sonrası motilite oranını % 73,15, hasarlı akrozom oranını % 13,5, % 7 gliserol içeren grupta alışım sonrası motilite oranını % 72,35, hasarlı akrozom oranını ise % 16,08 olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada sulandırıcıdaki gliserol miktarı arttıkça motilite yükselirken, toplam anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranının arttığını bildirmişlerdir.

Gliserolün sperma üzerine zararlı etkisi en çok ozmotik etki ile ilgilidir. Gliserol ilavesinden sonra, intraselüler suyun dışarı çıkmasına bağlı olarak hücre hızla küçülmektedir, daha sonrada daha yavaş bir şekilde orijinal hacmine dönmekte ve gliserol spermatozoona penetre olmaktadır (Hammerstedt ve ark., 1990). Ayrıca gliserolün dişi genital kanalında irritasyona yol açarak fertilitiyi azalttığı da bildirilmektedir (Abd elhakeam ve ark., 1991a).

Donma sırasında internal kryoprotektanların kullanılması (gliserol, DMSO) hücre içi ozmotik basıncı 1000 mOsmol/kg ın üzerine çıkarabilmektedir. Bu da 300 mOsmol/kg civarında bir ozmotik basınca sahip uterus ortamında hücrenin çok hızlı su alarak şişmesine ve plasma membranının zarar görmesine yol açabilmektedir (James, 2003).

Ball ve Vo (2001), aygır spermasının dondurulmasında gliserol, dimetil sülfoksit, etilen glikol ve propilen glikol olmak üzere 4 değişik kryoprotektan kullanmışlar ve gliserolün diğerlerine göre daha fazla ozmotik stres oluşturduğunu ve bu nedenle motilite ve akrozom bütünlüğünde değişimlere yol açtığını bildirmişlerdir.

Abd elhakeam ve ark. (1991b), yaptıkları çalışmada gliserolsüz sulandırıcılar ile koç spermasında kısa süreli saklamada % 67, dondurulmuş-çözünmüş spermada ise % 52 doğum oranı elde etmişlerdir.

Liu ve Foote (1998), boğa spermasında yaptıkları çalışmada Tris-yumurta sulandırıcısına hücre içi (gliserol, 1,2-propanediol) ve hücre dışı (NaCl, sükröz) kryoprotektanlar ekleyerek yaptıkları çalışmada, gliserol ilave etmeden 300 mOsm sükröz ilave ettikleri grupta % 46 çözüm sonu motilite oranı elde ederken, gliserol içeren grupta % 28 motilite oranı elde etmişlerdir.

1.7.2. Eksternal Kryoprotektanlar

Eksternal kryoprotektanlar oosit ve spermatozoonlarda hızlı soğutma ve ısıtma esnasındaki büzüşmeyi azalttıkları ve ortamdaki kristalizasyon oranını düşürdükleri için yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Bunların dondurma sıvısına ilavesinde düşük oranda permeabl kryoprotektan kullanılmakta, bu işlem oluşacak toksik etkiyi daha da azaltmaktadır (Arav ve ark., 1993; Mcwilliams ve ark., 1995).

External Kryoprotektanlar makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılabilirler.

1.7.2.1. Makromoleküller

Yüksek moleküler ağırlıklı kryoprotektan olarak makromoleküllerden en fazla kullanılanları polietilen glikol, ficoll 70, BSA, hydroxyethyl starch, dekstran, mannitol, polietilen oksit ve polivinilprolidon'dür. Bunlar az toksik etkiye sahip olmalarına rağmen, kendi aralarında da toksisite sınıflandırılması yapılabilir. Bu noktada ficoll 70, polietilen glikolden daha az toksiktir. Bu tür kryoprotektanlar dondurma solusyonuna ağırlık/hacim oranında katılırlar (Katkov ve ark., 1998).

1.7.2.2. 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. Disakkaritler membran yapılarını stabilize etmelerine rağmen, monosakkaritlerin böyle etkisi ya bulunmamakta ya da çok zayıf olarak bulunmaktadır. Fakat monosakkaritlerin hücreye hızla penetre olarak, dehidrasyonu engelledikleri olasıdır. Fare ve insan oositlerinde yapılan bir çalışmada monosakkaritlerin disakkaritlere göre daha etkili ozmotik tamponlayıcı olarak görev yaptığı bildirilmektedir. Sükroz ve trehaloz bu amaçlar için en çok kullanılan disakkaritlerdir (An ve ark., 2000; Mcwilliams ve ark., 1995; Palasz ve Mapletopt, 1996; Woelders ve ark., 1997).

Şekerler donma ve çözüm esnasında oluşan hasardan membran yapılarını, membranlardaki fosfolipitlerle etkileşime girip, yüzey artışı sağlayarak, fosfolipitlerde meydana gelen ısı değişimlerini azaltarak ve fosfolipit açıl zincirleri arasındaki van der waal's bağ etkileşimlerini azaltarak korurlar. Ayrıca hücreyle ortam arasında ozmotik tamponlayıcı olarak görev yaparak soğuk şokuna karşı koruma sağlamaktadır. Ortamda Ca^{+2} iyonlarının bulunması şekerlerin koruyucu etkisini attırmaktadır (Bakas ve Disalvo, 1991; Leeuw ve ark., 1993).

Şekerlerin koruyucu etkilerini molar ya da kitle konsantrasyonlarına göre gösterip göstermedikleri tartışma konusudur. Molar etkinin, ortamdaki elektrolit yoğunluğunu bastırarak ya da ortamdaki donmamış kanalların büyümesini sağlayarak gösterildiği belirtilmektedir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada şekerlerin kitlesel yoğunluğunun molar miktarlarına göre daha da etkinlik gösterdiği saptanmıştır (Koshimoto ve Mazur, 2002).

1.7.2.3. Sükroz

Bir disakkarit olan sükroz (sakkaroz), bir mol glukoz ve bir mol fruktozun birleşmesi ile oluşur. Bu iki monosakkaritin aldehit ve keton gruplarının birleşmesinden

oluştduğundan, serbest aldehit ve keton grubu ihtiva etmez, indirgeyici özelliği yoktur, ancak hidrolize edilebilir. Kullandığımız sofr şekeridir (Bingöl, 1983).

Yıldız ve ark. (2000) köpek spermasında yaptıkları çalışmada, Tris-sitrik asit sulandırıcısına 70 mM miktarında 9 farklı şeker (fruktoz, galaktoz, glukoz, xyloz, laktoz, trehaloz, maltoz, sükroz ve rafinoz) ilave etmişler sükroz içeren sulandırıcı grubunda sulandırma sonrası motilite oranını % 82,1, sükroz içeren sulandırıcı grubunda alışı sonras motilite oranını % 62,1 ve sükroz içeren sulandırıcı grubunda çözüm sonu motilite oranını % 38,6 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca aynı çalışma sonucunda, sulandırıcılara yapılan şeker ilavesinin (özellikle trehaloz, maltoz ve sükroz) alışı ve çözüm sonu sperma kalitesini arttırdığı (motiliteyi arttırırken, ölü spermatozoa oranını ve anormal spermatozoa oranını azaltmıştır) için sperma sulandırıcılarına şeker ilavesini tavsiye etmişlerdir.

Woelders (1997) sükrozun dondurma sırasında boğa sperması membran bütünlüğünü koruduğunu bildirmiştir. Sükroz hidrojen bağlarını fosfat grupları ya da membran fosfolipitleri ile düzenleyerek hücre zarını sağlamlaştırmakta ve böylelikle spermatozoonun dondurma ve çözdürme sırasında uğradığı şişme-küçülme gibi değişikliklere karşı ek bir koruma sağlayabilmektedir (Liu ve Foote, 1998).

Koç spermasının boğa, tavşan, insan gibi diğer türlere göre soğuk stresine daha duyarlı olduğu iyi bilinmektedir. Bu strese verilen yanıtta farklılık, ana olarak koç spermasının membran lipid kompozisyonundan kaynaklanmaktadır. Koç sperması diğer türlere göre daha yüksek çoklu doymamış/doymuş yağ asidi oranına ve daha düşük kolesterol/fosfolipid oranına sahiptir. Buna bağlı olarak spermatozoonun baş kısmında membran hasarı meydana gelmektedir (Ollero ve ark., 1998).

Sükroz içeren medyumlar, çözüm işlemine tabi tutulan embriyo ve spermatozoonların ozmotik şoka girmesini önlemek için ve intraselüler gliserolü uzaklaştırmak için kullanılırlar (Mazur, 1996).

Boğa spermasının dondurulması çalışmaları polivinilpirolidon ile sükroz kombinasyonunun kullanılması spermatozoa bütünlüğünü korumada başarılı sonuçlar vermemektedir (Leibo ve Brandley, 1999).

Abd elhakeam ve Rabie (2001) fransız alpine keçilerinde yaptıkları çalışmada Tris sitrik asit, Na-sitrat, Na-chloride sulandırıcılarına, değişik 10 şekeri (fruktoz, manose, maltose, laktoz, sükröz, trehaloz, rafinoz, erythritol, inositol ve sorbitol) 300 mOsm miktarında katmışlar, sükröz içeren Tris-sitrik asit sulandırıcısında sulandırma sonrası ortalama motilite oranını % $73,3 \pm 1,60$, çözüm sonu ortalama motilite oranını % $40,0 \pm 3,9$ olarak bildirmişlerdir.

Sztein ve ark. (2001) fare spermasında yaptıkları çalışmada, yağsız süttozu sulandırıcısına 0,3 M miktarında hücre içi (internal) (gliserol, formamide, propanediol, DMSO, adonitol) ve hücre dışı (eksternal) (laktoz, rafinoz, sükröz, trehaloz, d-mannitol) kryoprotektanlar ekleyerek yaptıkları çalışmada, % 61 ile en yüksek çözüm sonu motilite oranını sükröz içeren grupta bulmuşlar, ayrıca gliserol içeren sulandırıcı grubunda % 10 fertilite elde ederken sükröz içeren sulandırıcı grubunda % 80 fertilite elde etmişlerdir. Çalışma sonucunda fare spermasına uygun kombinasyonlarda katılan şekerlerin dondurma işleminde spermatolojik parametreleri arttırdığını bildirmişlerdir.

Muren ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada, yumurta sarısı-sitrat-gliserol sulandırıcısına sükröz, bsa (bovine serum albumin), Zn (çinko) ilavesinin dondurma sırasında keçi spermasına etkilerini araştırmışlar ve en yüksek çözüm sonu motilite oranını sükröz içeren grupta elde ederken bsa ve Zn içeren sulandırıcı gruplarında motilite oranlarında çok az bir artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, koç spermasının dondurulmasında tris,sitrik asit,yumurta sarısı sulandırıcısına katılan farklı oranlarda sükröz ile (100 mM, 250 mM, 500 mM) çözüm sonu spermatolojik parametreler bakımından daha iyi değerlere ulaşılması sağlanmaya çalışılarak, dondurulmuş koç spermasının pratikte kullanılabilme olanaklarının arttırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan yaşları 18 ay ve üzeri 4 baş ergin koç kullanılmıştır.

2.2. Hayvanların Bakım ve Beslenmesi

Çalışma süresince kullanılan koçlar Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Çiftliği koyunculuk ünitesinde sürüden ayrı olarak farklı bir bölgede barındırılmışlardır (Resim 2.1.). Çalışma öncesi koçlar sağlık kontrolünden geçirilmiş, antiparaziter sağaltım yapılmış, koçların genital bölgesi tıraş edilerek özellikle preputium etrafı kıl ve pisliklerden temizlenmiştir. Çalışmada kullanılacak olan koçların bakım ve beslenmelerine de özen gösterilmiş, koçlara günlük ihtiyaçlarına uygun rasyon hazırlanıp verilmiş, koçların rasyonlarına haftada 2 kez kesif yem ve kuru üzüm ilavesi yapılmış, koçların sürekli taze su almaları sağlanmıştır.

2.3. Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi

Sperma 4 baş koçtan suni vagen ile alınmıştır. Çalışmada kullanılacak koçların sperma verme ve suni vagenle alıştırılması çalışmalarına çiftleşme sezonu öncesi başlanmış ve çiftleşme sezonu başlayana kadar aralıksız devam edilmiştir. Sperma alma işleminde fantom olarak arama koçu ile kızgınlığı tesbit edilmiş koyunlar kullanılmıştır (Resim 2.3.). Çiftleşme sezonu içerisinde düzenli olarak koçlardan haftada iki kez suni vagenle sperma alınmış (Resim 2.4.) ve spermalar birleştirilerek (miks ejakülat) split sample yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Çalışmada, koç spermaları alındıktan sonra elde edilen birleştirilmiş ejakülatların önce makroskopik muayeneleri yapıp renk ve kıvamları, miktarları, (Resim 2.5.) motiliteleri, anormal spermatozoa oranları, ölü spermatozoa oranları, yoğunlukları ve pH parametreleri belirlenmiş ve değerler kaydedilmiştir.

Sperma numunelerinin muayenesinde kullanılan cam malzemeler önce pastör fırınında +250°C’de 2,5 saat bekletilerek sterilize edilmiş ve motilite tayinleri öncesi ısıtma tablasında +37°C’de bekletilerek ısıtılmaları sağlanmıştır.

2.3.1. Makroskopik Muayene

2.3.1.1. Spermanın Rengi ve Kıvamı

Sperma rengi, alınan spermaların birleştirildiği tüpte koyu krem, açık krem ve parlak beyaz görünüm olarak sınıflara ayrılarak tesbit edilmiştir.

Sperma kıvamı sperma toplama tüpünde kremadan sulu kıvama kadar 5 ile 0 arası değerlendirilmiştir.

2.3.1.2. Spermanın Miktarı

Koçlardan alınan ejakülatlar sperma miktarının belirlenmesi için derecelendirilmiş bir tüpte birleştirilmiş ve sperma miktarı tüp üzerinden okunarak mililitre (ml) olarak saptanmıştır.

2.3.1.3. Spermanın pH Değeri

Spermanın kimyasal muayenesinde, birleştirilmiş (miks) sperma numunelerinin pH değerleri pH indikatör kağıdı kullanılarak (5,5–9,0 Merck) belirlenmiş ve kaydedilmiştir.



Resim 2.1. Çalışmada kullanılan koçlar.



Resim 2.2. Sperma almada kullanılan gereçler.



Resim 2.3. Sperma alma işleminde kullanılan kızgın koyun.



Resim 2.4. Koçlardan suni vagen ile sperma alınması.

2.3.2. Mikroskopik Muayene

2.3.2.1. Spermatozoa Motilitesi

İleri doğru, güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösteren spermatozoonlara oranı olarak ifade edilen motilite; spermanın lam üzerindeki küçük bir damlası üzerine lamel kapatılarak, faz-kontrast ısıtma tablalı mikroskopta x200 büyütmede en az 3 değişik mikroskop sahasında muayene edilmiştir. Bulunan ortalama değer yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

2.3.2.2. Spermatozoa Yoğunluğu

Bir mililitre spermadaki spermatozoa sayısını ifade eden spermatozoa yoğunluğunun hesaplanmasında, hemositometrik yöntem ve spermatozoa yoğunluğunu veren formül kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar 10^9 /ml olarak kaydedilmiştir (Tekin, 1994).

Nativ spermalardan alınan numunelerin sulandırılması için 5 ml Hayem solüsyonu içeren tüplerden 10 μ lt solüsyon otomatik pipetle atılarak, 10 μ lt sperma numunesi konularak sperma numuneleri 1/500 oranında sulandırılmıştır.

Elde edilen sayı aşağıda verilen formüle yerleştirilerek spermatozoa yoğunluğu hesaplanmıştır.

$$\text{Spermatozoa Yoğunluğu} = \frac{\text{Sayılan Hücre (Spermatozoa Sayısı)}}{\text{Sulandırma Oranı} \times \text{Büyük Kare Hacmi (1/250)} \times \text{Sayılan Kare Sayısı (10)}} \times 1000$$

(10^9 / ml)

2.3.2.3. Anormal Spermatozoa Oranı

Sperma numunelerindeki anormal spermatozoa oranı sıvı fikzasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde Hancock solüsyonu (Hancock, 1952) kullanılmıştır.

Anormal spermatozoa oranının belirlenmesinde; Hancock solüsyonunda tespit edilen sperma numunesinden küçük bir damla temiz bir lam üzerine konularak üzerine lamel kapatılmıştır. Daha sonra sedir yağı damlatılan lam immersiyon objektif (x1000 büyütme) altında en az 400 spermatozoonun incelenmesi sonunda anormal yapı gösteren spermatozoa oranı yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

2.3.2.4. Ölü Spermatozoa Oranı

Nativ ve çözülmüş spermalardaki ölü spermatozoa oranını belirlemek için % 3'lük sodyum sitrat ile hazırlanmış, % 2'lik eosin boyası kullanılmıştır. Temiz ve kuru bir lam üzerine konulan bir damla spermanın yanına birkaç kat büyüklükte eosin boyası konulmuş, boya ile sperma lamel anacılığı ile karıştırılarak hızlıca froti çekilmiş ve fikzasyon amacı ile hazırlanan frotiler sıcak tablada hızla kurutulmuştur.

Hazırlanan preparatlar mikroskopta x400 büyütmede 400 spermatozoon sayılarak değerlendirilmiş ve ölü spermatozoon oranı yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Preparatların değerlendirilmesinde baş kısmı boya alan spermatozoonlar ölü , baş kısmı boya almamış spermatozoonlar canlı olarak değerlendirilmiştir.

2.4. Spermanın Sulandırılması ve Sulandırıcı Grupları

Koçlardan alınan ejakülatlardan makroskobik olarak normal ve motilitesi % 80'in üzerinde olanlar sperma toplama kadehlerinden otomatik pipet ile eşit miktarlarda alınarak önceden 37°C'lik su banyosunda bekletilerek ısıtılmış kuru bir deney tüpünde birleştirilmiştir.

Spermaların sulandırılmasında Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısı kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan olan Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısının kompozisyonu şu şekildedir:

Tris	3.63 g
Sitrik asit	1.50 g
Fruktoz	0.50 g

Distile su ile 100 ml.'ye tamamlanarak Tris stok sulandırıcısı hazırlanmıştır. Bu sulandırıcıya % 20 oranında yumurta sarısı emülsiyonu ve 100,000 IU penicilin-streptomisin solüsyonu ilave edilmiştir (Evans ve Maxwell, 1987).

Sperma sulandırıcısı spermanın alınmasından bir gün önce hazırlanıp, +4°C de buzdolabında ağzı parafilm ile sıkıca kapatılarak muhafaza edilmiştir. Sperma sulandırıcısı 7 ayrı erlen mayere her birisinde 10 ml olacak şekilde bölünmüştür. Bölünmüş sperma sulandırıcılarına 100 mM, 250 mM ve 500 mM oranlarında sukroz, birinci, üçüncü ve beşinci sulandırıcı gruplarına da % 4 gliserol ilave edilmiş, kontrol grubu olarak Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısı kullanılarak 7 farklı sulandırıcı grubu elde edilmiştir.

Sulandırıcı Grupları:

1. grup : Sperma Sulandırıcısına 100 mM sukroz ve % 4 gliserol ilavesi.
2. grup: Sperma Sulandırıcısına 100 mM sukroz ilavesi.
3. grup : Sperma Sulandırıcısına 250 mM sukroz ve % 4 gliserol ilavesi.
4. grup : Sperma Sulandırıcısına 250 mM sukroz ilavesi.
5. grup : Sperma Sulandırıcısına 500 mM sukroz ve % 4 gliserol ilavesi.
6. grup : Sperma Sulandırıcısına 500 mM sukroz ilavesi.
7. grup (kontrol grubu) : Kontrol grubu olarak sadece sperma sulandırıcısına %4 gliserol eklenerek sulandırılmış sperma kullanılmıştır.

Karıştırılmış ejakülatlar önceden 37°C lik su banyosunda bekletilerek ısıtılmış kuru deney tüplerine her birisinde 0,5 ml olacak şekilde otomatik pipetlerle bölünerek, hazırlanan 7 farklı sperma sulandırıcısı ile uygun tohumlama dozunun elde edilebilmesi için 1:7 oranında sulandırılmıştır.



Resim 2.5. Sperma alındıktan sonra dereceli kadeh ile miktarın ölçümü.



Resim 2.6. Spermaların payetlere çekildikten sonra sıcaklığı ayarlanabilir araç termosu ile Anabilim Dalı Laboratuarına taşınması.

Karıştırılmış ejakülatlar dikkatli, kademeli ve yavaş şekilde otomatik pipet ile sulandırıldıktan sonra sulandırma işleminin başarılı olup olmadığını kontrol etmek amacı ile motilitelerine bakılmıştır. Daha sonra numuneler sulandırıcı gruplarına göre önceden belirlenmiş farklı renklerde 0,25 ml'lik payetlere çekilerek, payetlerin açık uçları payet kapatma makinesi ile kapatılmıştır. Payetler gobletlere yerleştirilerek +4°C'yi sağlayan bir ayarlı ve soğutmalı araba buzdolabı içinde (Resim 2.6.) yaklaşık 20-25 dakika içerisinde Anabilim Dalı Laboratuvarına ulaştırılarak, +4°C'deki buzdolabına yerleştirilmiştir.

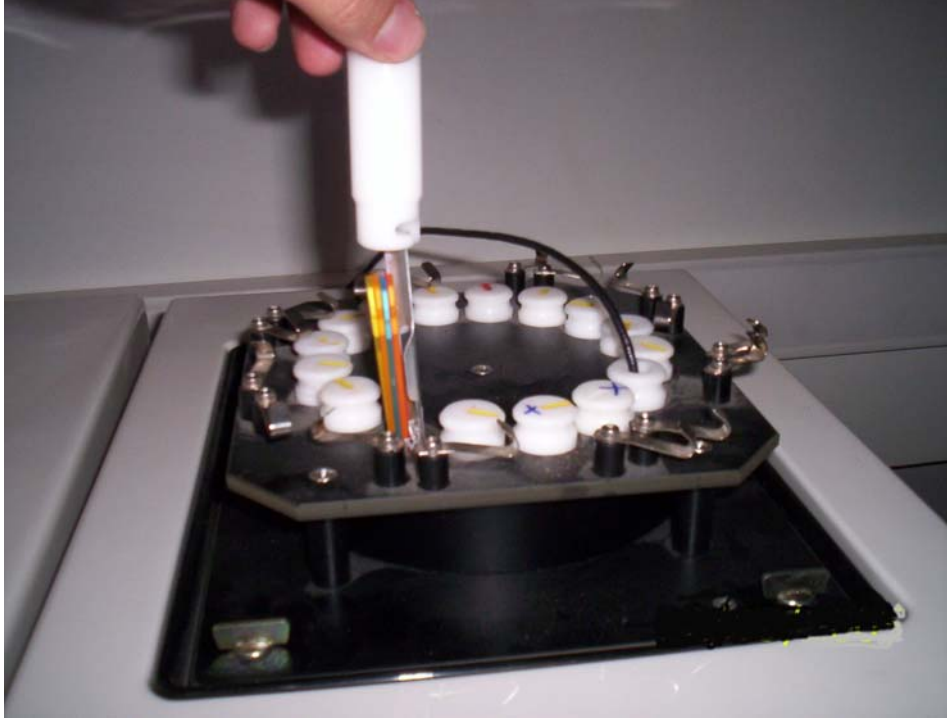
Sperma payetleri buzdolabında +4°C de 2,5 saat bekletilerek gerçekleştirilen ekilibrasyon işlemi sonrası spermatolojik parametrelerden motilite, ölü spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranı ve pH belirlenmiştir.

2.5. Spermmanın Dondurulması

Ekilibrasyon işlemi tamamlandıktan sonra payetler buzdolabından alınarak +4°C'yi sağlayan bir termos içerisinde dondurma makinesine nakledilerek, dondurma işlemi süresi ve sıcaklığı ayarlanabilen otomatik dondurma makinesinde gerçekleştirilmiştir (Resim 2.8.). Otomatik dondurma makinesi önceden -15°C /dakika hızla incek şekilde programlanmış, dondurma makinesi çalıştırılıp +4°C ye inince payetler yerleştirilerek (Resim 2.7.) 8 dakikada dondurma işlemi tamamlanmıştır. Dondurulan spermalar önceden üzerlerine uygulama numarası ve tarih yazılmış gobletlere yerleştirilerek, azot tankı içerisinde çalışma için ayrılmış kanisterlere konularak saklanmıştır.

2.6. Spermmanın Çözdürülmesi ve İn Vitro Değerlendirilmesi

Dondurulmuş spermalar sıvı azot tankında en az 2 hafta muhafaza edildikten sonra su banyosunda 37°C de ve 15 saniye içinde çözdürülmüş ve çözüm sonu spermatolojik parametreler (motilite, ölü-canlı, anormal, host) değerlendirilmiştir.



Resim 2.7. Payetlerin otomatik dondurma makinesine yerleştirilmesi.



Resim 2.8. Otomatik dondurma makinesi.

2.6.1. Hipoozmotik Swelling Test (Host)

Hipoozmotik Swelling Test'in yapılması için, 100 µl sperma, 900 µl 100 mOsmol fruktoz (Söderquist ve ark., 1997) solusyonu ile karıştırılarak + 37°C'de ki su banyosunda 5 dakika (Uysal ve ark., 2006) bekletilmiş ve ardından lam üzerine karışımdan yapılan frotiden (Uysal ve ark., 2005) faz kontrast mikroskopta 200 adet spermatozoa sayılmış ve kuyruğu kıvrılan spermatozoa oranı yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

2.7. Bulguların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Araştırmada elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanmıştır.

Çalışmanın istatistiksel analizleri S.P.S.S. 11,5 programı kullanılarak yapılmıştır.

Gruplar arasında farklılık olup olmadığını anlamak için tek yönlü varyans analizi (Anova) uygulanmıştır. Analiz sonucunda farklılık bulunduğunda, farklılığı yaratan grupları belirlemek için ikili karşılaştırma (Duncan) testi yapılmıştır.

Çalışmada, tüm testler iki yönlü olarak uygulanmıştır ve anlamlılık düzeyi (P) 0,05 ve 0,01 olarak alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Nativ Sperma Parametreleri

Dört baş koçtan alınan birleştirilmiş sperma numunelerinin (miks ejakülat) başlıca spermatolojik özelliklerinin değerlendirilmesi sonunda sperma miktarı en yüksek 4,5 ml, en düşük 3,4 ml ve ortalama $3,92 \pm 0,15$ ml olarak bulunmuştur. Motilite oranı en yüksek % 90, en düşük % 80 ve ortalama $85,00 \pm 1,54$ olarak bulunmuştur. Yoğunluk en yüksek $4,1 \times 10^9$ /ml, en düşük $2,7 \times 10^9$ /ml ve ortalama $3,40 \pm 0,15$ /ml olarak bulunmuştur. Anormal spermatozoa oranı en yüksek % 8,7, en düşük % 3,2 ve ortalama $5,53 \pm 0,70$ olarak bulunmuştur. Ölü spermatozoa oranı % 13,2, en düşük % 8 ve ortalama $10,73 \pm 0,84$ olarak bulunmuştur. pH değeri ise en yüksek 6,8, en düşük 6,4 ve ortalama $6,61 \pm 0,05$ olarak bulunmuştur. Nativ spermalardan elde edilen tüm muayene parametreleri ve değerleri Çizelge 3.1. de verilmiştir.

3.2. Alışım (Equilibrasyon) Sonrası Sperma Parametreleri

Alışım (ekilibrasyon) sonrası sperma numuneleri dondurulmadan önce başlıca spermatolojik parametrelerden spermatozoa motilitesi, ölü spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranı ve pH değerlendirilmiştir. Alışım işlemi sonrası elde edilen sperma parametreleri Çizelge 3.2. de verilmiştir.

Alışım sonrası motilite oranları; I., II., III., IV., V. ,VI. ve VII (kontrol) sulandırıcı gruplarında sırasıyla; $79,21 \pm 2,42$; $76,73 \pm 2,33$; $82,30 \pm 2,02$; $85,14 \pm 2,76$; $78,24 \pm 2,05$; $80,28 \pm 2,35$; $74,71 \pm 2,68$ olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, grup ortalamaları arası fark önemli bulunmuştur ($P < 0,05$) (Şekil 3.1.).

Ölü spermatozoa oranı; I, II, III, IV, V, VI. ve VII (kontrol) gruplarında sırasıyla; $11,18 \pm 0,80$; $12,50 \pm 0,92$; $9,57 \pm 1,41$; $9,12 \pm 0,65$; $13,80$

$\pm 1,27$; % $12,57 \pm 1,41$ ve $14,09 \pm 1,40$ olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, grup ortalamaları arası fark önemli bulunmuştur ($P < 0,05$).

Anormal spermatozoa oranı; I, II, III, IV, V, VI. ve VII (kontrol) gruplarında sırasıyla; % $10,60 \pm 1,50$; % $8,50 \pm 0,90$; % $6,85 \pm 0,90$; % $7,31 \pm 0,61$; % $8,57 \pm 0,47$; % $9,47 \pm 1,20$ ve % $11,15 \pm 0,78$ olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, grup ortalamaları arası fark önemli bulunmuştur ($P < 0,01$).

Ortalama pH değerleri, I, II, III, IV, V, VI. ve VII (kontrol) gruplarında sırasıyla; $6,73 \pm 0,09$; $6,61 \pm 0,24$; $6,67 \pm 0,15$; $6,72 \pm 0,12$; $6,64 \pm 0,22$; $6,69 \pm 0,21$ ve $6,65 \pm 0,16$ olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, elde edilen ortalama pH değerleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$).

3.3. Çözüm Sonu Spermatojik Muayene Parametreleri

Sperma payetlerinin muhafaza edildiği azot tanklarının azot seviyesi düzenli haftalık periyotlarla özel ölçüm cetveli ile kontrol edilmiş ve tankların düzenli olarak azot takviyeleri yapılmıştır. Sıvı azot tankında en az bir hafta muhafaza edilen sperma payetleri, ayarlanabilir dijital su banyosunda $+37^{\circ}\text{C}$ de ve 15 saniye içinde çözdürülmüş ve spermatojik parametreleri değerlendirilmiş, elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3., Şekil 3.2., Şekil 3.3., Şekil 3.4. ve Şekil 3.5. de gösterilmiştir.

3.3.1. Spermatozoa Motilitesi

Çözüm sonu motilite oranları; I, II, III, IV, V, VI. ve VII (kontrol) gruplarında sırasıyla; % $43,14 \pm 4,45$, % $29,00 \pm 5,38$, % $59,14 \pm 3,02$, % $54,00 \pm 4,76$, % $36,00 \pm 3,05$, % $26,28 \pm 3,35$ ve % $46,71 \pm 4,68$ olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, grup ortalamaları arası fark önemli bulunmuştur ($P < 0,01$).

3.3.2. Ölü Spermatozoa Oranı

Ölü spermatozoa oranı; I, II, III, IV, V, VI. ve VII (kontrol) gruplarında sırasıyla; % 38,71 ± 4,30; % 46,00 ± 5,41; % 33,42 ± 3,90; % 34,57 ± 3,35; % 43,57 ± 4,27; % 46,28 ± 3,09 ve % 35,42 ± 3,40 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, grup ortalamaları arası fark önemli bulunmuştur (P< 0,05).

3.3.3. Anormal Spermatozoa Oranı

Anormal spermatozoa oranı; I, II, III, IV, V, VI. ve VII (kontrol) gruplarında sırasıyla; % 19,71 ± 3,59; % 20,42 ± 2,14; % 13,85 ± 2,19; % 13,71 ± 1,60; % 19,57 ± 2,63; % 20,42 ± 2,57 ve % 22,57 ± 3,04 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, grup ortalamaları arası fark önemli bulunmuştur (P< 0,05).

3.3.4. Hypoozmotik Swelling Test (Host)

Host sonuçları; I, II, III, IV, V, VI. ve VII (kontrol) gruplarında sırasıyla; % 41,00 ± 3,26; % 28,00 ± 5,44; % 55,00 ± 5,38; % 52,00 ± 5,77; % 36,14 ± 3,76; % 25,14 ± 2,60 ve % 50,85 ± 3,76 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, grup ortalamaları arası fark önemli bulunmuştur (P< 0,01).

Çizelge 3.1. Birleştirilmiş nativ koç spermalarında (miks) belirlenen spermatolojik parametreler.

Birleştirilmiş (Miks) Nativ Sperma Parametreleri						
Uygulama No	Miktar (ml)	Motilite (%)	Yoğunluk (10^9 / ml)	Anormal Spz. (%)	Ölü Spz. (%)	pH
1	4,0	85,0	3,1	4,5	8,0	6,8
2	4,0	90,0	2,7	3,2	9,2	6,7
3	3,5	80,0	3,2	8,7	11,5	6,6
4	3,8	85,0	3,7	6,7	9,0	6,4
5	4,5	80,0	4,1	5,2	13,2	6,5
6	3,4	90,0	3,5	4,0	10,5	6,6
7	4,3	85,0	3,3	6,2	14,0	6,7
X	3,92	85,00	3,40	5,53	10,73	6,61
Sx ⁻	0,15	1,54	0,15	0,70	0,84	0,05

Çizelge 3.2. Alışım sonrası spermatolojik parametreler.

Sulandırıcı Grupları	Motilite (%) (X ± Sx) (n = 7)	Ölü Spz. (%) (X ± Sx) (n = 7)	Anormal Spz. (%) (X ± Sx) (n = 7)	pH (X ± Sx) (n = 7)
1. Grup	79,21 ± 2,42 ab	11,18 ± 0,80 b	10,60 ± 1,50 c	6,73 ± 0,09 a
2. Grup	76,73 ± 2,33 a	12,50 ± 0,92 b	8,50 ± 0,90 b	6,61 ± 0,24 a
3. Grup	82,30 ± 2,02 c	9,57 ± 1,41 a	6,85 ± 0,90 a	6,67 ± 0,15 a
4. Grup	85,14 ± 2,76 c	9,12 ± 0,65 a	7,31 ± 0,61 a	6,72 ± 0,12 a
5. Grup	78,24 ± 2,05 ab	13,80 ± 1,27 c	8,57 ± 0,47 b	6,64 ± 0,22 a
6. Grup	80,28 ± 2,35 b	12,57 ± 1,41 bc	9,47 ± 1,20 bc	6,69 ± 0,21 a
7. Grup (Kontrol Grubu)	74,71 ± 2,68 a	14,09 ± 1,40 a	11,15 ± 0,78 c	6,65 ± 0,16 a
Önemlilik Derecesi (P)	*	*	**	—

— : (P>0,05) Grup ortalamaları arası fark önemsiz

* : (P< 0,05) Grup ortalamaları arası fark önemli

** : (P< 0,01) Grup ortalamaları arası fark önemli

a,b,c,d : Aynı sütunda ortak harf taşımayan grup ortalamaları arası fark önemli

Çizelge 3.3. Çözüm sonu spermatolojik parametreler.

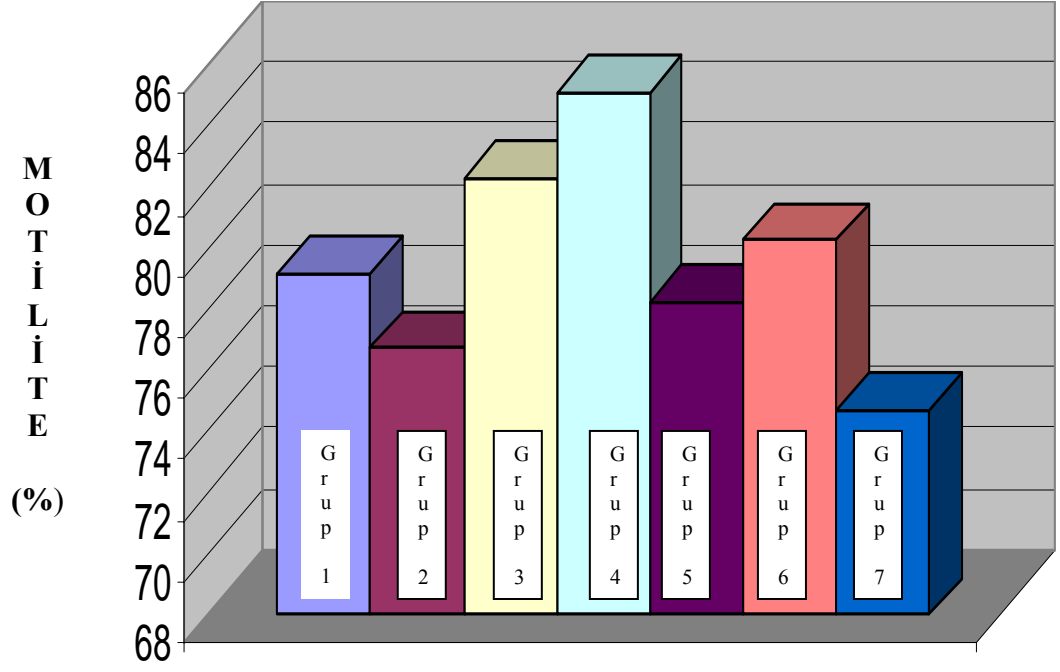
Sulandırıcı Grupları	Motilite (%) (X ± Sx) (n = 7)	Ölü Spz. (%) (X ± Sx) (n = 7)	Anormal Spz. (%) (X ± Sx) (n = 7)	Host (%) (X ± Sx) (n = 7)
1. Grup	43,14 ± 4,45 a	38,71 ± 4,30 ab	19,71 ± 3,59 a	41,00 ± 3,26 a
2. Grup	29,00 ± 5,38 b	46,00 ± 5,41 c	20,42 ± 2,14 a	28,00 ± 5,44 b
3. Grup	59,14 ± 3,02 c	33,42 ± 3,90 a	13,85 ± 2,19 b	55,00 ± 5,38 c
4. Grup	54,00 ± 4,76 c	34,57 ± 3,35 a	13,71 ± 1,60 b	52,00 ± 5,77 c
5. Grup	36,00 ± 3,05 d	43,57 ± 4,27 bc	19,57 ± 2,63 a	36,14 ± 3,76 a
6. Grup	26,28 ± 3,35 b	46,28 ± 3,09 c	20,42 ± 2,57 a	25,14 ± 2,60 b
7. Grup (Kontrol Grubu)	46,71 ± 4,68 a	35,42 ± 3,40 a	22,57 ± 3,04 a	48,85 ± 3,76 c
Önemlilik Derecesi (P)	**	*	*	**

* : (P< 0,05) Grup ortalamaları arası fark önemli

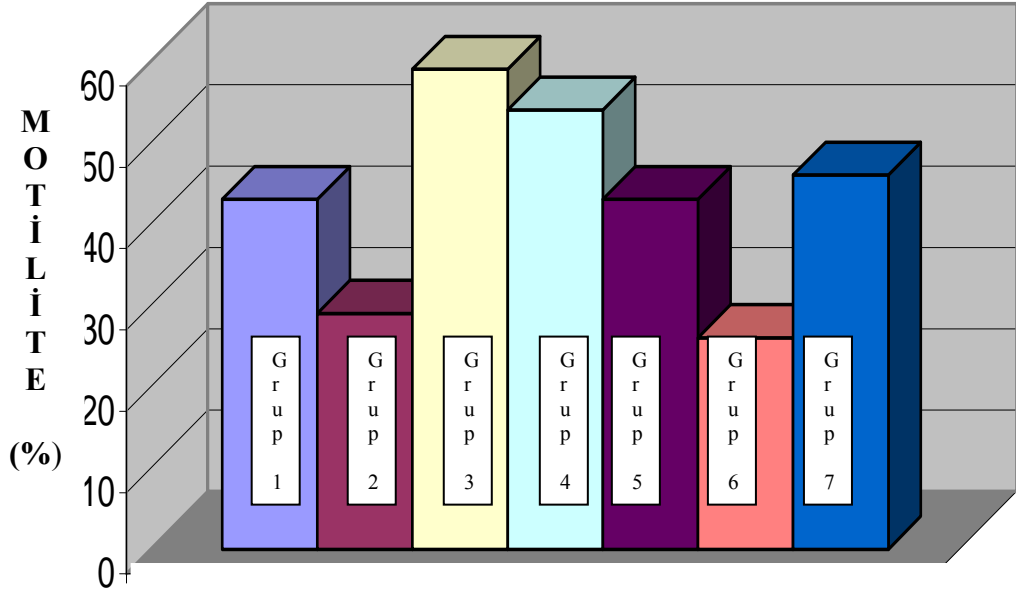
** : (P< 0,01) Grup ortalamaları arası fark önemli

a,b,c,d : Aynı sütunda ortak harf taşımayan grup ortalamaları arası fark önemli

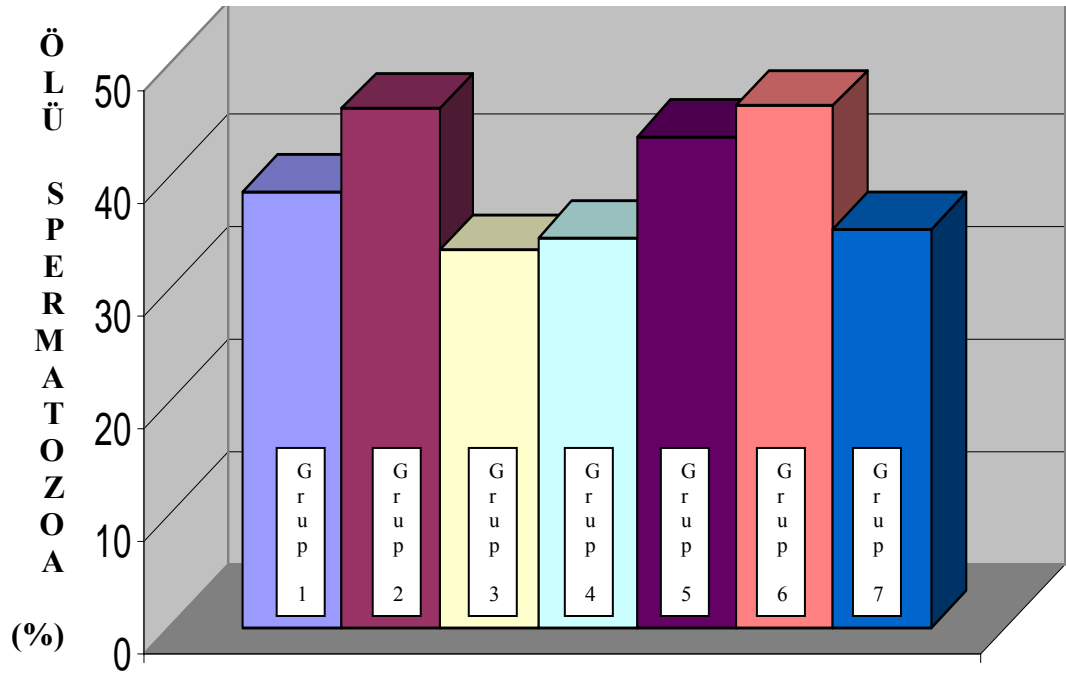
Şekil 3.1. Alışım sonrası motilite ortalamaları.



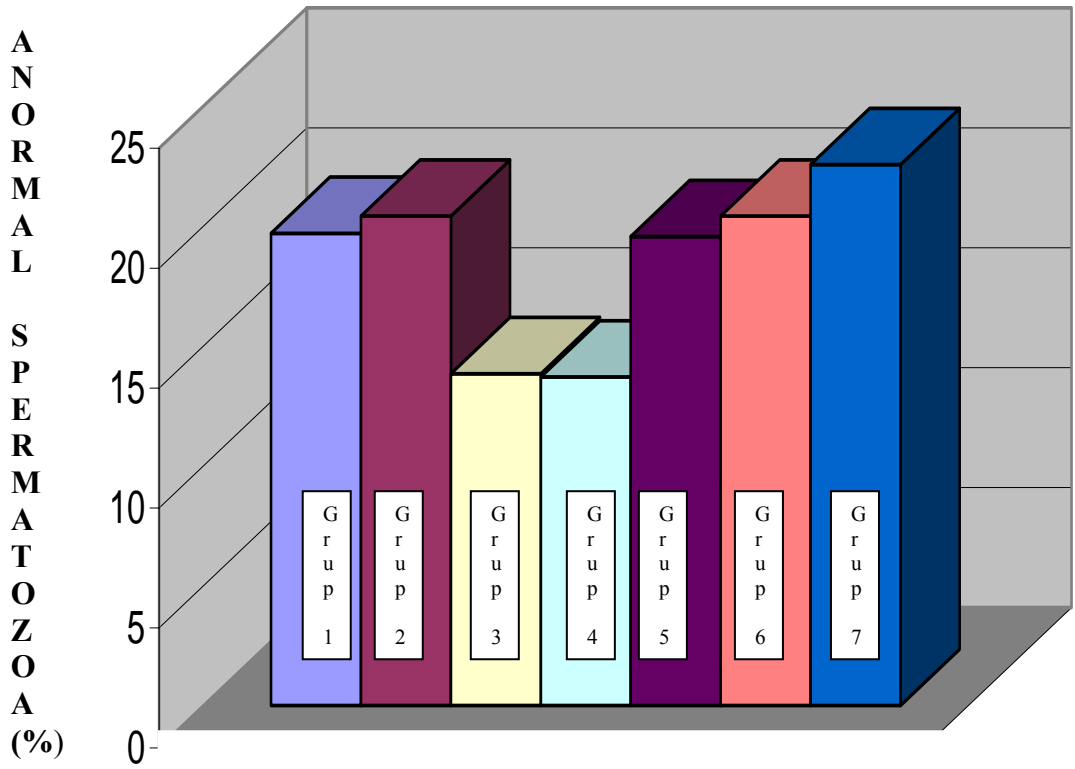
Şekil 3.2. Çözüm sonrası motilite ortalamaları.



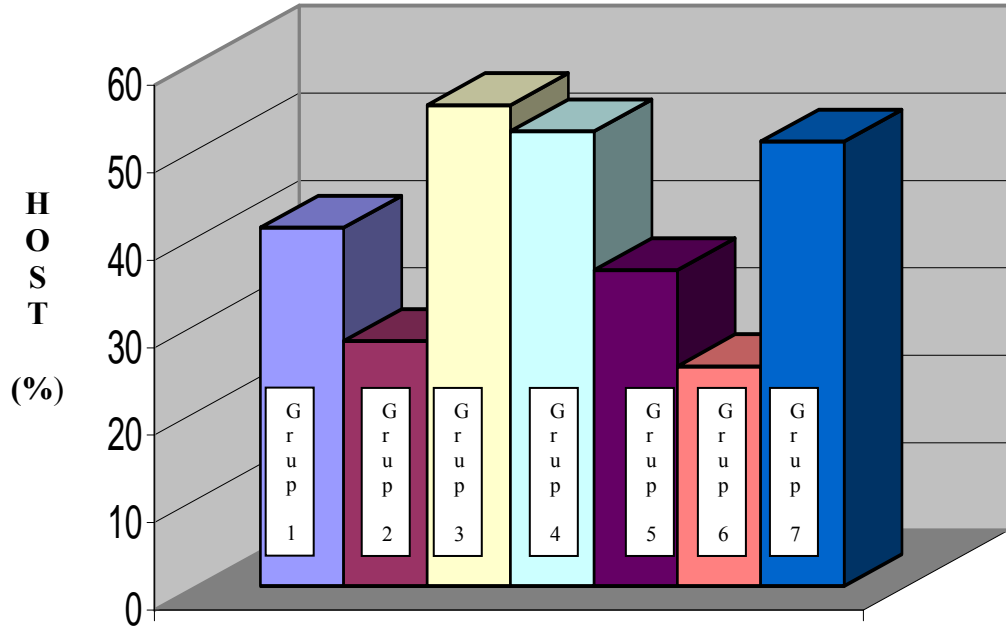
Şekil 3.3. Çözüm sonrası ölü spermatazoa oranı ortalamaları.



Şekil 3.4. Çözüm sonrası anormal spermatazoa oranı ortalamaları.



Şekil 3.5. Çözüm sonrası host ortalamaları.



4. TARTIŞMA

Türkiye’de koyun popülasyonunun hayvancılık sektörü içinde önemli bir paya sahip olması, yeterli verim düzeyinde bulunmayan koyunlarımızın ıslah edilmesi ve verimlerinin arttırılmasını kaçınılmaz hale getirmiştir. Bunun da başlıca yolu, yüksek verimli ve sağlıklı koçların spermalarını sulandırarak hacimlerini çoğaltmak, böylece bir koçtan tohumlanacak koyun sayısını arttırmaktır. Bu alanda en geçerli yöntem koç spermasının dondurularak saklanması ve tohumlamada kullanılmasıdır. Yöntemin uygulanabilirliğinin sağlanması ise koç spermasının başarılı olarak dondurulmasında ve suni tohumlamada kullanıldıktan sonraki döl veriminde ortaya çıkan sorunların çözümlenmesine bağlıdır (Gökçen, 1983).

Koç spermasının başarılı bir şekilde dondurularak tohumlamada ve türün ıslahında kullanılması koyun yetiştiriciliğini doğrudan etkileyecektir. Koç spermasının soğutulması, dondurulması ve payetlenmesi esnasında motil spermatozoa oranı önemli ölçüde düşmektedir (Taşdemir ve ark., 2003). Ancak, koç spermasının başarıyla dondurulması için yapılan araştırmalar sağlayacağı büyük yararları nedeniyle yoğunluğunu ve güncelliğini korumaktadır (Tekin ve Günzel, 1986).

Koç sperma hücrelerinin dondurma işlemi sırasında soğuk şokuna karşı duyarlılık göstermeleri, hücreler üzerindeki hasarı arttırarak çözüm sonrası spermatolojik özellikleri ve fertilitiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bunun için sperma sulandırıcılarına katılacak koruyucu kimi katkı maddeleriyle dondurma işlemi ve ortamda gelişecek soğuk şoku hasarı azaltılabilmektedir. Bu çalışmada da farklı sulandırıcılar kullanılarak çözüm sonu spermatolojik özelliklerin iyileştirilmesi sağlanmaya çalışılmıştır.

Sunulan çalışmada kullanılan 4 baş koçun ejakülatlarında dondurma işleminden önce, gerek spermalar hakkında genel bir bilgi edinebilmek, gerekse dondurmada kullanılabilirlik durumlarını saptamak amacıyla başlıca spermatolojik özellikler incelenmiştir.

Çalışmada 4 baş koçun 7'şer ejakülatında saptanan nativ spermatozoa motilitesi en düşük % 80, en yüksek % 90 ve ortalama $85 \pm 1,54$ olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değer, Tekin ve ark. (2006)'nın $73,5 \pm 13,3$, Paulenz ve ark. (2002)'nin % 70, Taşdemir ve ark. (2003)'ün $81,55 \pm 0,64$, Yıldız (2004)'in $77,0 \pm 5,37$, Gill ve ark. (2003b)'nin %70, Uysal ve ark. (2000)'nin $76,55 \pm 1,34$ olarak saptadıkları motilite oranından yüksek, Bag ve ark. (2002)'nin % 90 olarak saptadıkları motilite oranından düşük, Soylu (1988)'in % 83,2, Tekin ve ark. (1991)'nin % 84,4 lük motilite oranları ile bu araştırmada elde edilen ortalama motilite oranının uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

Çalışmada nativ spermatozoa yoğunluğu en düşük $2,7 \times 10^9/ml$, en yüksek $4,1 \times 10^9/ml$ ve ortalama $3,40 \pm 0,15 \times 10^9/ml$ olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değerlerin kimi araştırmacıların bildirdikleri değerler ile uyum içerisinde olduğu (Tekin ve ark., 1991; Taşdemir ve ark, 2003 ; Gill ve ark. 2003b, Tekin ve ark., 2006), kimi araştırmacıların (Uysal ve ark., 2000; Koşum ve Wassmuth, 2000; Söderquist ve ark., 1997; Gil ve ark., 2003a) bildirdikleri yoğunluk değerlerinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmada nativ anormal spermatozoa oranı en düşük % 3,2, en yüksek % 8,7 ve ortalama $5,53 \pm 0,70$ olarak bulunmuştur. Bu değer Tekin ve ark. (1991)'nin $3,5 \pm 0,07$, Yıldız (2004)'in $3,97 \pm 1,69$, Gündoğan ve Demirci (1999)'nin $3,63 \pm 0,57$ ve Aral ve Tekin (1996)'in sıfat sezonu içerisinde akkaraman koçlardan elde ettikleri $2,73 \pm 0,54$ anormal spermatozoa oranlarından yüksek, Uysal ve ark. (2000)'nin % 11,7, Taşdemir ve ark. $17,15 \pm 0,70$, Erdinç ve ark. (1987)'nin % 9,28, Gill ve ark. (2003a)'nin % 10 olarak bildirdikleri anormal spermatozoa oranından düşük, Tekin ve ark. (2006)'nin sakız ırkı koçda $5,8 \pm 1,25$ olarak buldukları değerle uyumlu olarak bulunmuştur.

Araştırmada nativ spermada ölü spermatozoa oranı en düşük % 8,0, en yüksek % 14,0 ve ortalama $10,73 \pm 0,84$ olarak bulunmuştur. Bu değer Tekin ve ark. (2006)'nin $14,3 \pm 5,4$ 'lük ölü spermatozoa oranından düşük, Uysal ve ark. (2000)'nin % 9,6'lük ölü spermatozoa oranında yüksek ve Erdinç ve ark. (1987)'nin % 10,83'lük ölü spermatozoa oranı ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Araştırmada nativ spermanın pH değeri en düşük 6,4, en yüksek 6,8 ve ortalama $6,61 \pm 0,05$ olarak bulunmuştur. Elde edilen pH değeri Uysal ve ark. (2000)'nin $6,75 \pm 0,05$ ve Erdiñç ve ark. (1987)'nin 7,8'lik, değerinden düşük, Gündoğan ve Demirci (1999)'nin $6,59 \pm 0,03$ değerinden yüksek, Tekin ve ark. (2006)'nin sakız ırkı koçta buldukları $6,6 \pm 0,2$ değeri ile uyumlu bulunmuştur.

Araştırmada elde edilen nativ koç ejakülatlarında dondurma işleminden önce saptanan başlıca spermatolojik özelliklerin ortalama değerleri ile, diğer bazı çalışmalarda bildirilen veriler arasında oluşan farklılıkların koçların genotipi, yaşı, ırkı, bakım-besleme ve diğer çevre koşulları, sperma alma aralığı, sperma alma yöntemi ve değerlendirme metodlarının değişik olması nedeniyle ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte elde edilen spermatolojik parametrelerin, koçlarda bildirilen normal sınırlar içerisinde bulunduğu ve alınan spermaların dondurulmaya elverişli olduğu tespit edilmiştir.

Spermatozoa motilitesi, bir yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz veya diğer hareket çeşidi gösterenlere oranı olarak tanımlanmakta ve motil spermatozoonların döllenme güçleri olduğu bilinmektedir (Tekin, 1990). Bunun için özellikle sun'i tohumlama çalışmalarında ve yetiştiricilikte erkek damızlıklardaki spermatozoa motilitesinin saptanmasının önemi büyüktür (Daşkın, 1991).

Çalışmada, alıştırma işlemi sonrası en yüksek motilite oranı ortalaması $\% 85,14 \pm 2,76$ ile Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısına 250 mM sükröz ilavesi içeren IV. sulandırıcı grubunda elde edilmiş, kontrol grubu ile aralarındaki fark önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur. Bu da sükrözün özellikle 250 mM oranında eklendiğinde sükröz eklenmeyen kontrol grubuna ve 100 mM ve 500 mM sükröz eklenen gruplara göre alıştırma sürecinde motilite oranına etkisi bakımından daha yararlı olduğunu ortaya koymuştur.

Araştırmada çözüm sonu en yüksek motilite oranı $\% 59,14 \pm 3,02$ ile tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısına 250 mM sükröz ve $\% 4$ gliserol ilavesi içeren III. sulandırıcı grubunda bulunmuştur. En düşük çözüm sonu motilite oranı ise $\% 26,28 \pm 3,35$, ile tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısına 500 mM sükröz ilavesi içeren VI. sulandırıcı grubunda bulunmuştur. Kontrol grubunda (7.

grup) ise iki ortalamanın arasında bir değer (%46,71 \pm 4,68) elde edilmiştir. Bu da sükrozun belli oranlarda (250 mM) katıldığında çözümler sonu motilite değerlerine olumlu etki gösterdiğini bunun altında (100 mM) ve özellikle üzerinde (500 mM) katıldığında ise kötüleşmeye yol açtığını göstermiştir.

Bu çalışmada elde edilen çözümler sonu motilite oranı, Tekin ve ark. (2006)'nın tris sulandırıcısına 20- 80 mM arasında taurin ilave ettikleri çalışmada % 26,50 \pm 15,0 - % 38,70 \pm 9,4, Taşdemir ve ark. (2003)'nin taurin içeren tris ve hepes sulandırıcıları ile yaptıkları çalışmada % 21,84 \pm 0,79 - % 46,05 \pm 1,65, Günay ve ark. (2003)'nin sıfat sezona girişte ve sıfat sezonunda tris-yumurta sarısı sulandırıcısı kullanarak yaptıkları çalışmada sırasıyla % 17,8 ve % 42,7, Pastor-Martinez ve ark. (2004)'nin dört farklı sulandırıcı kullanarak koç spermasında yaptıkları çalışmada % 19,3 \pm 1,9 - % 44,4 \pm 2,9 olarak buldukları çözümler sonu motilite oranlarından yüksek, Uysal ve ark. (2000)'nin değişik antioksidanlar içeren tris ve hepes sulandırıcıları ile yaptıkları çalışmada % 42,00 \pm 2,60 - 65,50 \pm 2,33 olarak buldukları motilite oranlarından düşük, Sanchez-Partida ve ark. (1999) 'nin Tris ve Hepes sulandırıcıları ile yaptıkları çalışmada % 27,0 \pm 4,90 - 58,4 \pm 2,1 olarak tespit ettikleri motilite oranları ile uyumlu bulunmuştur.

Anormal yapılı spermatozoonların fertilizasyon güçlerinin olmaması ve kimi kalıtsal kusurları taşıması bakımından, spermatozoon morfolojisinin önemli olduğu ileri sürülmektedir (Tekin, 1990). Benzer şekilde Evans ve Maxwell (1987), spermatozoonun morfolojik muayenesinin sperma kalitesi yönünden ayrıntılı bir test olduğunu ve anormal spermatozoa oranının yüksek olması durumunda, fertilite düşüklüğüne yol açabileceği, bu nedenle %15 ten fazla anormal spermatozoa içeren spermaların suni tohumlamada kullanılmaması gerektiğini bildirmektedirler.

Çalışmada çözümler sonu en düşük anormal spermatozoa oranı % 13,71 \pm 1,60 ile tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısına 250 mM sükroz ilavesi içeren IV. sulandırıcı grubunda elde edilmiştir. En yüksek anormal spermatozoa oranı % 22,57 \pm 3,04 ile tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı içeren kontrol grubunda elde edilmiştir. Bu sonuçlar da çalışmada hangi oranda eklenirse eklensin (100 mM, 250

mM, 500 mM) sükrözün dondurma – çözündürme işlemleri sırasında membran bütünlüğünü sükröz içermeyen gruba göre daha iyi koruduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmada elde edilen anormal spermatozoa oranı, Sönmez ve Demirci (2004) 'nin farklı oranlarda gliserol (% 0, % 1, % 3, % 5 ve % 7) ve farklı oranlarda askorbik asit (% 0, % 0,5, % 1, % 2 mg/ml) içeren 20 sulandırıcı kullandıkları çalışmada buldukları % 21,12 – % 49,90 arası anormal spermatozoa oranlarından düşük, Uysal ve ark. (2000)'nin 6 farklı sulandırıcı (tris-1, tris-2, tris-3, hepes-1, hepes-2, hepes-3) kullandıkları çalışmada buldukları % 10,50 – 26,50 anormal spermatozoa oranları ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Çalışmada bulduğumuz sonuçları destekler şekilde, Santymire ve ark. (2006), Hams F10 + Hapes sulandırıcısına farklı oranlarda (270, 400, 500, 700 mOsm) sükröz ilave etmişler ve en yüksek motiliteyi (% 52,3) ve en düşük hasarlı akrozom oranını 270 mOsm sükröz ilave edilen sulandırıcı grubunda elde etmişlerdir.

Çalışmada en yüksek çözüm sonu host oranı % $55,00 \pm 5,38$ ile tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısına 250 mM sukroz ve % 4 gliserol ilavesi içeren III. Sulandırıcı grubunda tespit edilmiştir. Çalışmamızda en düşük çözüm sonu host test oranı % $28,00 \pm 5,44$ ile tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısına 100mM sükröz ilavesi içeren II. sulandırıcı grubunda elde edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen host ortalamaları, Aisen ve ark. (2002)'nin koç spermasında farklı trehaloz oranları (0-400 mOsmol) kullanarak yaptıkları çalışmada buldukları % 38,8 - % 91,5 arası, Söderquist ve ark. (1997)'nin koç spermasında farklı çözüm prosedürleri (70⁰C de 5 saniye, 50⁰C de 9 saniye, 35⁰C de 12 saniye) kullanarak yaptıkları çalışmada buldukları % 64,6 – % 66,9 arası host ortalamalarından düşük, Uysal ve ark. (2004)'nin koç spermasında farklı taurin oranları (20, 50, 0 mM) kullanarak yaptıkları çalışmada buldukları % 25,7 – % 35,4 arası host ortalamalarından yüksek bulunmuştur.

Hipoozmotik swelling test, spermatozoon plazma membranının fonksiyonel bütünlüğünü değerlendirmekte kullanılan bir testtir. Bu testin sonuçlarının yüksek olması (%50 \leq) motilite, in vivo ve in vitro fertilitte parametreleri ile yakından

ilişkilendirilmektedir (Neild ve ark., 1999). Tartagni ve ark. (2002), insanlarda yaptıkları çalışmada düşük host skoruna sahip erkeklerin diğer spermatolojik parametreleri normal olsa bile intra-uterin tohumlama ve in vitro fertilizasyon çalışmalarında düşük gebelik oranlarına sahip olduklarını bildirmişlerdir. Çalışmada da en yüksek host değerleri 250 mM süktroz ilavesi içeren 3. ve 4. sulandırıcı gruplarında (%55 ve % 52) olarak elde edilmiştir. Ayrıca elde edilen bu değerler kontrol grubunda elde edilen % 48,85 lik host değerinden yüksek bulunmuştur.

Çalışmada saptanan çözüm sonu spermatolojik özellikler ile literatür bulguları arasında görülen farklılıklar kullanılan koçların farklı ırk, genetik yapı ve yaşta olmasından, hayvanların damızlıkta kullanma süre ve sıklıklarının değişik olmasından kaynaklanabileceği gibi kullanılan sperma sulandırıcıları ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranlarının, özellikle gliserol ve süktroz oranlarının farklılığından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca spermatolojik özelliklerde saptanan bu farklılıklar, spermanın sulandırılmasında, dondurulmasında ve değerlendirilmesinde kullanılan tekniklerin farklılığından da ileri gelmiş olabilir. Spermanın dondurulması aşamasında gerçekleştirilen alıştırma süreleri, donmuş spermanın çözme sıcaklık ve süreleri ile ejakülat sayılarının farklı olması da sonuçlar üzerine etkili olmuş olabilir. Ayrıca, koçların bulunduğu coğrafi bölge, bu bölgenin koordinatları, koçların çiftleşme sezonunda olup olmadığı, çevre, bakım ve özellikle besleme koşulları da spermatolojik parametrelerin değişik olmasında etkili olmuş olabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Koyun yetiştiriciliğinde verim düzeylerinin artırılması için koç spermalarının sulandırılarak hacimlerinin artırılması, saklanması ve suni tohumlama yapılması en geçerli yöntemdir. Böylece yüksek verimli koçlardan alınıp saklanan spermalar ıslah çalışmalarında ve yetiştiricilikte kullanılırken, erkek damızlık masrafları da düşürülmüş olacaktır. Bununla birlikte, dondurulmuş – çözündürülmüş spermalar ile yapılan servikal tohumlamalarda başarı oranı düşük kalırken laparoskopik tohumlamalar ile başarı oranı yükselmektedir. Laparoskopik tohumlama yönteminin yüksek maliyet gerektirmesi ve pratikte kullanımının zorluğu uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır. Ancak son yıllarda koç spermasının farklı tekniklerle dondurulması ile daha iyi çözüm sonu değerlere ulaşılmış ve bunlarla yapılan tohumlamalar ile kabul edilebilir fertilitite oranları yakalanmaya başlanmıştır.

Koç spermasının dondurulmasında soğuktan koruyucu madde (kryoprotektan) olarak gliserol ile birlikte şekerler de kullanılmaktadır. Kryoprotektan olarak kullanılan şekerler katıldıkları oran ve özelliklerine göre hücresel dehidrasyon oluşturarak, hücre içindeki donacak su miktarını azaltarak kristalizasyon esnasında zarar görecektir hücre oranını düşürmektedirler.

Çalışmada, gliserollü ve gliserolsüz hazırlanan tris sulandırıcıları ile 3 farklı oranda (100 mM, 250 mM ve 500 mM) sükröz ilave edilmiş spermaların dondurulması ve çözümü sonrasında, spermatozoa motilite değerlerinde 250 mM sükröz içeren 3. ve 4. sulandırıcı gruplarında (% 59,14 ve % 54,0) kontrol grubuna (% 46,71) göre istatistiki olarak önemli derecede iyileşme sağlandığı gözlenmiştir. 100 ve 500 mM sükröz içeren 1., 2., 5. ve 6. sulandırıcı gruplarında (% 43,14, %29,0, %36,0 ve %26,28) ise kontrol grubuna (% 46,71) göre daha düşük çözüm sonrası spermatozoa motilite değerleri elde edilmiştir. Yukarıda ki sonuçlara benzer şekilde çözüm sonu ölü spermatozoa ve host değerleri 250 mM sükröz ilavesi içeren 3. ve 4. sulandırıcı gruplarında kontrol grubuna göre daha iyi değerlere ulaşmış, fakat istatistiki bir fark elde edilememiştir. Çözüm sonu anormal spermatozoa değerlerinde ise tüm gruplarda kontrol grubuna göre iyileşme sağlanmıştır (Çizelge 3.3.).

Araştırmadan alınan sonuçlara göre sperma sulandırıcılarına ilave edilen sükrozun özellikle 250 mM oranında katıldığında önemli iyileşmeler sağladığı ancak daha düşük (100 mM) ve daha yüksek (500 mM) oranlarda ilave edilmesinin kötüleşmeye yola açtığı gözlenmiştir. İlave edilen tüm oranlarda sükrozun (100 mM, 250 mM, 500 mM) çözümü sonu anormal spermatozoa oranlarını kontrol grubuna göre azaltması, sükrozun birçok araştırmada belirtilen hücrel dehidrasyonla ozmotik basıncı değiştirme ve hücre membranını hasarlardan koruduğu etkisini doğrulamaktadır (Woelders, 1997; Liu ve Foote, 1998; Leeuw ve ark., 1993; Marinov ve ark., 1980).

Yapılan birçok çalışmada host sonuçlarının yüksek olması (% 50 ≤) motilite, in vivo ve in vitro fertilitte parametreleri ile yakından ilişkilendirilmektedir (Ducci ve ark., 2002; Buckett ve ark., 1997). Çalışmada 250 mM sükroz ilavesi içeren 3. ve 4. sulandırıcı gruplarında host sonuçlarının yüksek çıkması (% 55 ve % 52), bu sulandırıcı gruplarına ait spermalar ile yapılacak tohumlamalar da kabul edilebilir fertilitte oranları elde edilebileceğini düşündürüp bizi umutlandırmıştır.

Çalışmada gliserol içermeyen sulandırıcı grubunda da (4. grup) yüksek çözümü sonu değerler elde edilmesi diğer bazı literatürleri (Abd elhakeam, 1988, Abd elhakeam ve ark., 1991a) destekler şekilde koç spermasının gliserolsüz olarak dondurulabileceğini ve çözümü sonu iyi değerler elde edilebileceği göstermiştir.

Sunulan çalışma da kısmen de olsa beklenen sonuçlara ulaşılmıştır. Ancak daha kesin sonuçların ortaya çıkabilmesi için in vitro değerlendirmeler yanında dölverimi sonuçları içeren çalışmaların da yapılması gereklidir.

ÖZET

Koç Spermasının Farklı Oranlarda Sükroz İçeren Sulandırıcılar İle Gliserollü ve Gliserolsüz Dondurulması

Bu çalışmanın amacı, koç spermasının dondurulmasında gliserollü ve gliserolsüz sulandırıcılara katılan farklı oranlarda sükrozun, çözüm sonu parametreler üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmada 4 baş koç kullanılmıştır. Çiftleşme sezonu içerisinde düzenli olarak koçlardan haftada iki kez suni vagenle sperma alınmış ve makroskopik olarak normal ve motilitesi % 80'in üzerinde olan spermalar birleştirilmiştir (miks ejakülat). Miks ejakülatlar split sample yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Spermaların sulandırılmasında Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısı ana sulandırıcı olarak kullanılmıştır. Sperma sulandırıcısına 100 mM sukroz ve % 4 gliserol ilave edilerek 1., 100 mM sukroz ilave edilerek 2., 250 mM sukroz ve % 4 gliserol ilave edilerek 3., 250 mM sukroz ilave edilerek 4., 500 mM sukroz ve % 4 gliserol ilave edilerek 5., 500 mM sukroz ilave edilerek 6. ve sadece % 4 gliserol ilave edilerek 7. (kontrol) grup olmak üzere toplam 7 farklı sulandırıcı grubu elde edilmiştir. Karıştırılmış ejakülatlar hazırlanan 7 farklı sperma sulandırıcısı ile uygun tohumlama dozunun elde edilebilmesi için 1:7 oranında sulandırılmıştır.

Sperma payetleri buzdolabında +4°C de 2,5 saat bekletilerek gerçekleştirilen dengeleme işlemi sonrası otomatik dondurma makinesinde -15°C /dakika hızla 8 dakikada dondurulmuştur. Sıvı azotta tutulan dondurulmuş spermalar su banyosunda 37°C de ve 15 saniye içinde çözündürülmüş ve çözüm sonu spermatolojik parametreler (motilite, ölü-canlı, anormal, host) değerlendirilmiştir.

Çalışmada, çözüm sonrası spermatozoa motilitesinde 250 mM sükroz ilavesi içeren 3. ve 4. sulandırıcı gruplarında (% 59,14 ve % 54,0) kontrol grubuna (% 46,71) göre istatistiki olarak önemli derecede iyileşme sağlandığı gözlenmiştir (P< 0,01). 100 ve 500 mM sükroz içeren 1., 2., 5., 6. sulandırıcı gruplarında (% 43,14, %29,0, %36,0, %26,28) ise kontrol grubuna (% 46,71) göre daha düşük çözüm sonrası spermatozoa motilite değerleri elde edilmiştir. Yukarıda ki sonuçlara benzer şekilde çözüm sonu ölü spermatozoa ve host değerleri 250 mM sükroz ilavesi içeren 3. ve 4. sulandırıcı gruplarında kontrol grubuna göre daha iyi değerlere ulaşmış, fakat istatistiki bir fark elde edilememiştir. Çözüm sonu anormal spermatozoa değerlerinde ise tüm gruplarda kontrol grubuna göre iyileşme sağlanmıştır.

Araştırmadan alınan sonuçlara göre sperma sulandırıcılarına ilave edilen sükrozun özellikle 250 mM oranında katıldığında önemli iyileşmeler sağladığı ancak daha düşük (100 mM) ve daha yüksek (500 mM) oranlarda ilave edilmesinin kötüleşmeye yola açtığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Gliserol, Koç, Kryopreservasyon, Sperma, Sükroz.

SUMMARY

Freezing of ram semen with glycerol containing or lacking diluents containing different proportion of sucrose

The aim of this study was to investigate the effect of different proportions of sucrose added into the diluents containing or lacking glycerol on the parameters obtained following thawing of ram semen.

Four rams were used in the study. Sperm was collected by the aid of an artificial vagina twice a week regularly in breeding season from the rams, and sperms determined to be normal macroscopically and having a motility ratio above 80% were mixed together (mixed ejaculate). Mixed ejaculates were evaluated according to split sample method.

Tris-citric acid-fructose-egg yolk was used as the main diluent in the dilution of the sperms. Seven different diluent groups (6 test one control) were established for the investigation. Test groups, group 1-6, were formed by adding 100 mM of sucrose and 4% glycerol group 1, 100 mM of sucrose group 2, 250 mM of sucrose and 4% glycerol group 3, 250 mM of sucrose group 4, 500 mM of sucrose and 4% glycerol group 5, and 500 mM sucrose group 5, respectively into the sperm diluents. Group 7 where only 4% of glycerol was added into the sperm diluents constituted the control group. Mixed ejaculates were diluted with the proportion of 1/7 with these 7 groups of sperm diluents in order to obtain appropriate insemination dose.

After equilibration process performed with incubation at +4°C for 2.5 hours, sperm straws were frozen in an automatic freezing machine in 8 minutes at a cooling rate of -15°C / minutes. Straws stored frozen in liquid nitrogen were thawed in 37°C water bath in 15 seconds, and spermatological parameters (motility, nonviable/viable spermatozoa, abnormal spermatozoa, host) were evaluated.

In the study, statistically significant ($P < 0,01$) improvement was achieved in sperm motility (59,14% and 54,0%) in groups 3 and 4, respectively, containing 250 mM of sucrose as an ingredient of diluent when compared to the control group (46,71%). Lower post-thaw sperm motilities (43,14%, 29,0%, 36,0%, and 26,28%) were respectively observed in groups 1, 2, 5, and 6 containing 100mM and 500 mM sucrose compared to the control group (46,71%). Similarly, as mentioned before, better post-thaw nonviable/viable spermatozoa and host rates were achieved in groups 3 and 4 than control group, however, no statistically significant difference was found between these groups. In addition, post-thaw abnormal spermatozoa rates were found to be better in all groups than the control group.

As a conclusion, important improvements in spermatological characteristics were obtained when a concentration of 250 mM of sucrose was added into the semen diluents, nevertheless, when lower (100mM) and/or higher (500mM) sucrose concentrations were used detrimental effects were encountered in the parameters.

Key Words

: Cryopreservation, Glycerol, Ram, Semen, Sucrose.

KAYNAKLAR

- ABD ELHAKEAM, A.A. (1988). Studies on freezing ram semen in absence of glycerol. Doktora Tezi. Minnessota Üniversitesi.
- ABD ELHAKEAM, A.A., GRAHAM E.F., VAZQUEZ, I.A., CHALONER, K.M., (1991a). Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. *Cryobiology*. **28**: 43-49.
- ABD ELHAKEEM, A.A., GRAHAM, E.F., VAZZQUEZ, I.A. (1991b). Studies on the presence and absance of glycerol in unfrozen and frozen ram semen:fertility trils and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*. **28(1)**:36-42.
- ABD ELHAKEAM, A.A. and RABİE, Z. B. (2001). Storageability and survival of french alpine goat spermatozoa as affected by type of extender and sugar. El-Doki Animal Production Research Institute Conferance-Egypt.
- ADAMS, M. (1994). Monosaccharides, disaccharides and glycerol. Erişim Adresi: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Gliserol> Erişim Tarihi: 14.06.2005.
- AHMADI A. and SOON-CHYE, N.G. (1992). The single sperm curling test a modified hypo-osmotic swelling test as a potential technique for the selection of viable sperm for inracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. **68**:346-350.
- AİSEN, E.G., MEDİNA V.H., VENTURİNO, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*. **57**:1801-1808.
- AK, K. (1996). Spermanın saklanması. Evcil hayvanlarda reproduksiyon ve sun'i tohumlama. 100-110. Masa Üstü Yayımcılık. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını ders notu:59.
- AKÇAPINAR, H. (1994). Koyun yetiştiriciliği. Ankara:Medisan yayınevi. 1. baskı.
- ALAÇAM, E. (1997). Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. Ankara: Medisan Yayınevi 1. baskı.
- AL-HAKİM, M.K., ISSA, H.H., AL-JUBURI, S.A.H. (1989). Monthly and seasonal variation in some semen characters of awassi rams. in proceedings. **2**:691-696.
- ALVARENGA, M. A., LANDIM ALVARENGA, F. C., MOREIRA, R. M., CESARINO, M. M. (2000). Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Equine Veterinary Journal*, **32(6)**: 541-545.
- ALTINIŞIK, M. (2005). Lipidlerin yapısal ve işlevsel özellikleri. Erişim Adresi: www.mustafaaltinisik.org.uk/56-1-2-05.ppt. Erişim Tarihi:12.04.2006.
- AN, T. Z., IWAKIRI, M., EDASHIGE, K., SAKURAI, TAKASHI, M. (2000). Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa. *Cryobiology*, **40**: 237-249.

- ANONİM (2005). Türkiye küçükbaş hayvan varlığı. Erişim Adresi:www.tuik.gov.tr. Erişim Tarihi:12.09.2007.
- ARAL F., TEKİN N. (1996). Koçlarda sperma kalitesi üzerine mevsimin etkisi. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*. **6(1-2)**:15-20.
- ARAV, A., SHEHU, D., MATTIOLI, M. (1993). Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *Journal Of Reproduction And Fertility*, **99**: 353-358.
- ATAMAN, M.B., ÇOYAN, K. (1996). Koyunların donmuş-çözünmüş sperma kullanılarak laparoskop yardımı ile intrauterin tohumlanması. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*. **6(1-2)**:31-34.
- BAG, S., JOSHI, A., RAWAT, P.S., MITTAL, J.P. (2002). Effect of initial freezing temperature on semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in semi-arid tropical environment. *Small Ruminant Research*. **43**:23-29.
- BAKAS, L. S., DISALVO, E. A. (1991). Effect of ca^{+2} on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*, **28**:347-353.
- BALL, B.A., VO, A. (2001) Osmatic tolerance of equine spermatazoa and effects of soluble cryoprotectans on equine sperm motility, viability, and mitochondril membrane potential. *J. Androl*. **22**:1061-1069.
- BİNGÖL, G. (1983). Biyokimya. Disakkaritler. 4. Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. syf:21-23.
- BUCKETT, W.M., FARQUARSON, R.G., LUCKAS, M.J.M., KİNGSLAND, C.R., AIRD I.A., LEWIS-JONES, D.I. (1997). The hypo-osmotic swelling test in recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*. **68(3)**:506-509.
- BUCAK, M.N. (2003). Kryoprotektanlar ve eşey hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. Seminer. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- BUCAK, M.N., TEKİN, N. (2007). Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **54(1)**:67-72.
- ÇETİNKAYA, K. (1984). İzmir, aydın ve manisa illerindeki koyunculğun, yapısal ve çevresel özellikleri içinde döl verimi durumu. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsü. Yayın No:64.
- CHEN, Y., FOOTE, R.H., BROCKETT, C.C. (1993). Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull semen. *Cryobiology*. **30**:423-431.
- COLAS, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on thr survival and fertilizing ability of deep-frozezen ram semen. *J. Reprod. Fertil*. **42(2)**:277-285 (Abstrakt).

- CORREA, J.A., HEERSCH, G., ZAVOS, P.M. (1997). Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology*. **47**:715-729.
- ÇOYAN, K. (2002). Evcil hayvanlarda dölleme ve suni tohumlama. Ders notları. Konya:Selçuk Üniversitesi basımevi.
- CUPPS, P.T., MCGOWAN, B., RAHLMAN, F.D., REDDON, R.A., WEIR, C.W. (1990). Seasonal changes in the semen of ram lambs: reproductive hormone concentrations as indicators of postpubertal reproductive function. *Can. J. Anim. Sci.* **70**:149-157.
- DAŞKIN, A. (1991). Teke spermasının dondurulması ve değişik yöntemlerle östrusları senkronize edilen ankara keçilerinin tohumlanmalarından elde edilen dölverimi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- DUCCI, M., GAZZANO, A., VILLANI, C., CELA, V., ARTINI, P.G., MARTELLI, F., GENAZZANI, A. R. (2002). Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *European J Obstet Gynaecol and Reprod. Biol.* **102(1)**: 53-56.
- EMRE, B. (1993). Pineal bez ve melatonin. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* **40 (3)**:336-345.
- ERDİNÇ, H., GÖKÇEN, H., ÇAMAŞ, H., ÇEKGÜL, E., ŞENER E. (1987). Değişik düzeylerde vitamin a ve vitamin e içeren rasyonlarla beslenen koçların sperma verimi ve özellikleri üzerine araştırmalar. *Uludağ Üniv. Vet. Fak. Derg.* **5-6(1-2-3-)**:97-101.
- EVANS, G. and MAXWELL, W.M.C. (1987). Salamon's artificial inseminations of sheep and goats. Butterworths Pty Limited. Australia.
- FIRST, N.L., SEVINÇ, A., HENNEMAN, H.A. (1961). Fertility of frozen and unfrozen ram semen. *Journal of Animal Science.* **20(1)**:79-84.
- FOOTE, R.H. (2002). The history of artificial insemination:selected notes and notables. American Society of Animal Science.
- GAO, D. Y., CRISTER, J. K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Ilar Journal.* **41(4)**.
- GİLL, J., LUNDEHIM, N., SODERQUIST, L., RODRÍGEZ-MARTINEZ, H. (2003a). Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. **59**:1241-1255.
- GİLL, J., LUNDEHIM, N., SODERQUIST, L., RODRÍGEZ-MARTINEZ, H. (2003b). Fertility of ram semen frozen in bioexcel and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. **59**:1157-1170.
- GOMES, G. M., JACOP, J. C. F., MEDEIROS, A. S. L., PAPA, F. O., ALVARENGA, M. A. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the mangalarga marchador breed. *Theriogenology*, **58**: 277-279.
- GONZALES, R., POINDRON, P and SIGNORET, P.J. (1988). Variation in the and testosterone responses of rams after the introduction of östrus females during the breeding season. *J. Report. Fert.* **83**:201-208.

- GÖKÇEN, H. (1977). Koç spermasının kimi özellikleri, dondurulması ve dondurulan spermanın dölverimi üzerine araştırmalar. Doktora tezi. *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü*. Yayın No:48.
- GÖKÇEN, H. (1983) Koç spermasının dondurulması ve dölveriminde kimi sorunlar ile bu sorunların çözümüne ilişkin araştırma bulguları ve öneriler. *Uludağ Ü. Vet. Fak. Derg.* **2(2)**:9-14.
- GÖKÇEN, H. (1990). Koyun – keçi hastalıkları ve yetiştiriciliği. Tüm Vet hayvancılık Hizmetleri Yayını No:2, sf:485-494. İstanbul.
- GÖKÇEN H., SOYLU, M.K., OĞAN, İ. (2000). Sıvı azotta dondurulan koç spermasının spermatolojik özellikleri ve değişik yöntemlerle tohumlamada kullanılması üzerine araştırmalar. *Türk J. Vet. Anim. Sci.* **24**:539-544.
- GÜNAY, Ü., NUR, Z., DOĞAN, İ., BAŞPINAR B., SOYLU, M.K. (2003). Sıfat sezonuna geçiş döneminde ve sıfat sezonunda koç spermasının dondurulabilirliğinin araştırılması. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.* **22(1-2-3)**:81-85
- GÜNDOĞAN, M., DEMİRCİ, E. (1999). Koçlarda scrotal sıcaklık artışının spermatogenezis ve diğer spermatolojik özellikler üzerine etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bil. Dergisi. **13(2)**:193-200.
- GÜRSOY, O., KİRAZLAR, N., TOKUN, O. (1996). Küçükbaş hayvanlarda sperma özellikleri, toplama ve değerlendirme. *Ç.Ü.Z.F. Derg.* **7(4)**:61-66.
- HAFEZ, E.S.E. (1987). Physiology of reproduction. *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea & Febiger. Sf:85-128.
- HAFEZ E.S.E. (1993). Semen evaluation. *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea & Febiger. Sf:405-423.
- HAFEZ, B. and HAFEZ, E.S.E. (2000). *Reproduction in farm animals*. 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Maryland-U.S.A.
- HAMMERSTEDT, RH., GRAHAM JK., NOLAN JP. (1990). Cryopresarvation of mammalian sperm:what we ask them to survive. *J. Androl.* **11**:73-88.
- HANCOCK, J.L. (1952). The morphology of bull spermatozoa. *J. Exp. Biol.* **29**:445-453.
- HOLT, W. T. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, **53**: 47-58.
- İLERİ, K. (1994). Reprodüksiyon ve suni tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Masaüstü Yayıncılık Ünitesi. Ders Notu No:23
- JACKSON, T. H., UNGAN, A., CRISTER, J. K., GAO, D. (1997). Novel microwave technology for cryopreservation of biomaterials by suppression of apperant ice formation. *Cryobiology*, **34**: 363-372.
- JAMES, E. (2003). More on frozen semen. <http://www.gvequine.com.au/moreonfrozensemen>
Erişim tarihi:24.09.2003

- KATKOV, I. I., KATKOVA, N., CRİSTER, J. K., MAZUR P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, **37**: 325-338.
- KAYA, A. ÇOYAN, K. (1998). Anöstrüs dönemindeki koyunlarda melatonin ve koç etkisi uygulamalarının bazı üreme parametrelerine etkileri. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*. **8(1-2)**:103-110.
- KAYMAKÇI, M., SÖNMEZ, R. (1992). Koyun yetiştiriciliği. Hasat Yayıncılık. İstanbul: Hayvancılık Serisi 3.
- KNOBİL, E., NEİLL, J. (1988). The physiology of the reproduction. Raven Press. Newyork. Ph:810-815
- KOSHIMOTO, C., and MAZUR, P. (2002). The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. *Cryobiology*. **45**:80-90.
- KOŞUM N., WASSMUTH, R. (2000). Koyunlarda tohumlama derinliği, servikovaginal sıvı miktarı ve spermanın vaginal bölgeye geri akmasının tohumlama başarısına etkileri üzerine bir araştırma. *Türk J. Vet. Anim. Sci.* **24**:29-37.
- KUMAR, N., RANGAWKAR, G.R., KUMAR, R. (1999). Effect of filtration on seminal plasma electrolytes in buffalo bull. *Indian Vet. J.* **68(5)**:493-494.
- LEIBO, S. P., BRANDLEY, L. (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. The Male Gamet, Cache River Press, 502-515.
- LEIBO, S. P., SONGSASEN, N. (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, **57**: 303-326.
- LEEUW, F. E. D., LEEUW, A. M. D., DAAS, J. H. G., COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, **30**: 32-44.
- LİU, Z., FOOTE, R.H. (1998). Osmatic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and non-permeable agents. *Cryobiology*. **37**:207-218.
- MARIA, R.F.S., MILAGROS, C.E., VIDAL, M., ANA, J.S., JOSE, J.G. (2006). Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of iberan red deer (*cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. *The American Society of Andrology, Journal of Andrology* (Basımda).
- MARINOV, P., TORINOV, A., DİKOV, V., and CORLOVAN, P. (1980). Acrosomal proteolytic activity as a method for evaluation of the cryoprotective action of diluents for freezing of ram semen. *9th International Congress On Animal Reproduction & Artificial Insemination- Madrid*. **5**:521-525. (Absrakt).
- MCWILLIAMS, R. B., GİBBONS, W. E., LEIBO, S. P. (1995). Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono-and disaccharides. *Human Reproduction*, **10 (5)**: 1163-1171.

- MAXWELL, W.M.C., SALAMON, S. (1993). Liquid storage of semen: a Review. *Reprod. Fertil. Dev.* **5**:613-638
- MAZUR, P. (1996). Principles of medical cryobiology: the freezing of living cells, tissues, and organs. cell chemistry and phyology, JAI Press Inc, s: 355-384.
- MUREN, S. Z., WANG, J., YAN, W., XU, Z., XU, R. (1997). Effect of sucrose, bovine serum albumin and zn on cryopreservation of goat spermatozoa. *Acta-Veterinaria et Zootechnica, Sinica.* **28(2)**: 120-125.
- NEİLD, D., CHAVES, G., FLORES, M., MORA, N., BECONİ, M. ve AGÜERO, A. (1999). Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, **51(4)**:721-727.
- NUR, Z., AK, K. (2003). Donmuş spermanın saklanması ve eritilmesi. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.* **22(1-2-3)**:97-102.
- OLLERO, M., PEREZ-PE, R., MUİNO-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 reproduksiyon ve suni tohumlama. İ. Ü. Vet. Fak. Yay. Rektörlük No: 3209, Dekanlık No: 4. İstanbul.
- PALASZ, A. T., MAPLETOPT, R. J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances.* **14 (2)**: 127-149.
- PASTOR-MARTINEZ, F., JOHANNISSON, A., GİL, J., KAABI, M., ANEL, L., PAZ, P., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2004). Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain jc-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozer-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science.* **84**:121-133.
- PAULENZ, H., SODERQUIST, L., PEREZ-PE, R., BERG, K.J. (2002). Effect of different extenders and storage temparatres on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology.* **57**:823-836.
- ROSA, H.D.J., BRYANT, M.J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research.* **48**:155-171.
- ROTA, A., PENZO, N., VINCENTI, L., MANTOVANI, R. (2000). Hypoosmotic swelling (hos) as a screening assasy for testing in vitro fertiliy of bovine spermatozoa. *Theriogenology.* **48**:1115-1125.
- SAKARYA, E., (1998). Türkiye’de koyunculuk ve önemi. *Ekin.* Yıl:2 sayı:3 33-37
- SANFORD, M.L., PALMER, M.W., HOWLAND, D.E.D. (1974). Seasonal varidation of serum levels of lh and testosterone in the ram. *Can. J. Anim. Sci.* **58**:128-129 (Abstract).
- SALAMON, S. (1967). Observation on fertility of ram semen frozen by different methods. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry.* **7**:559-561.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* **62**:77-111.

- SANCHEZ-PARTIDA, G.L., WINDSOR, D.P., EPPLESTON, J., SETCHELL, B.P., CHISHOLM MAXWELL W.M. (1999). Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen – thawed ram semen. *Journal of Andrology*. **20**:280-288.
- SANTYMIRE, R.M., MARINARI, E.P., KREEGER, J.S., WILDT, D.E., HOWARD, J.G. (2006). Sperm viability in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) is influenced by seminal and medium osmolality. *Cryobiology*. **53**:37-50.
- SEVİNÇ, A. (1984). Dölerme ve sun'i tohumlama. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları. No:397. Ankara: A.Ü. Basımevi.
- SOYLU, M.K. (1988). Çeşitli sulandırıcılar ve yöntemler kullanılarak dondurulan koç spermalarının bazı spermatolojik özellikleri üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- SOYLU, K.M., GÖKÇEN, H., TÜMEN, H., DOĞAN, İ. (1991). Değişik ırklarda ithal koçların bazı androlojik özellikleri üzerine araştırmalar. *Hay. Araşt. Derg.* **1(1)**:35-37.
- SÖDERQUIST, L., BURY-MADRİD, N. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (1997). Assesment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*. **48**:1115-1125.
- SÖNMEZ, M., DEMİRCİ, E. (2004). The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. *Türk J. Vet. Anim. Sci.* **28**:893-899.
- SZTEİN, J.M., NOBLE, K., FARLEY, J.S., MOBRAATEN, L.E. (2001). Comparison of permeating and non-permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. **41**:28-39.
- TARTAGNI, M., SCHONAUER, M.M., CİCİNELLİ E., SELMAN, H., ZIEGLER D., PETRUZZELLİ F., ADDARİO, V. (2002). Usefulness of the hypo-osmotic test in predicting pregnancy rate and outcome in couples undergoing intrauterine insemination. *Journal of Andrology*. **23**:498-502.
- TAŞDEMİR U., KİNET, H., ÖZCAN, İ., YURTSEVEN, R. TUNCER, P.B. (2003). Farklı sulandırıcılar kullanılarak dondurulmuş çözdürülmüş koç sperması ile laparoskopik intrauterin tohumlama. *Lalahan Hayvancılık Aratırma Enstitüsü Dergisi*. **43(1)**:1-8.
- TEKİN, N., GÜNZEL, A.-R. (1986). Koç spermasının değişik sulandırıcılarla dondurulması ve in vitro değerlendirme yöntemleri üzerine araştırmalar. *A. Ü. Vet. Fak. Dergisi*. **33(3)**: 381-393.
- TEKİN, N. (1990). Erkek üreme organlarının muayenesi (androlojik muayeneler). *Theriogenology*. Nurol Matbaacılık: Ankara.
- TEKİN, N. (1994). Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite*. Dizgievi:Konya. 7.Bölüm.

- TEKİN, N., APEL, A-R., YURDAYDIN, N., YAVAŞ Y., DAŞKIN, A., KESKİN, O., ETEM, H. (1991). Östrusları senkronize edilen koyunlarda suni tohumlama yöntemiyle elde edilen dölverimi. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* **38(1-2)**: 60-73.
- TEKİN, N. (2000). Yetiştiricilikte suni tohumlamanın önemi. Türkiye 2000 Hay. Kong., 57-60. Kızılcahamam-Ankara.
- TEKİN N. UYSAL, O., AKÇAY E., YAVAŞ İ. (2006). Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. **53(3)**:179-184.
- TRİMBERGER, W.G. (1974). Artificial insemination. *Reproduction in Farm Animals.* p:145-174. London.
- UYSAL, O., KİNİT, H., ÇEVİK, M., ÇETİNKAYA, S. (2000). Değişik antioksidanlar içeren farklı sulandırıcılarla dondurulmuş koç spermalarından elde edilen dölverimi. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* **47(2)**:177-189.
- UYSAL, O, YAVAŞ, İ., VARIŞLI, Ö., BUCAK, M.N. (2004). Değişik taurin konsantrasyonlarıyla dondurulmuş koç spermatazonlarında membran bütünlüğünün değerlendirilmesi. 3. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Kongresi. 30 Eylül-2 Ekim 2004. Çolaklı-Manavgat Antalya. Tebliğ özetleri kitabı. Syf:75.
- UYSAL, O., BUCAK, M.N., YAVAŞ, İ., VARIŞLI Ö. And GÜRCAN, İ.S. (2005). Evaluation of ram sperm frozen with various taurine concentrations. *Indian Vet. J.* **82**:1059-1061.
- UYSAL, O., KORKMAZ, T., BUCAK M.N., YAVAŞ, İ. (2006). Evaluation by hypoosmotic swelling-eosine test of cryopreserved bovine spermatozoa. *Indian Vet. J.* **83**:557-559.
- VINHA, N.A. and COUBROUGH, R.I. (1972). Deep freezing of ram semen. *J. S. Afr. Vet. Ass.* **43(1)**:43-45.
- WALKER, E.K., PONZONİ, W.R., WALKEY, W.R.C., MORBEY, C.S.A. (1985). The development of male reproductive traits in progeny of merino strains of different reproductive performance. *Anim. Reprod. Sci.* **8**:61-78.
- WATSON, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, **60-61**: 481-492.
- WATSON, P.F., MARTIN C.A. (1975). Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Aus. J. Biol. Sci.* **28**:153-159.
- WIEMER, E.K. and RUTTLE, L.J. (1987). Semen characteristics, scrotal circumference, and bacterial isolates of fine wool range rams. *Theriogenology.* **28(2)**:625-637.
- WILSON, K. (1999). Sheep breeding: ram reproductive tract. Erişim Adresi: www.dpi.qld.gov.au. Erişim Tarihi:12.06.2006.

- WOELDERS, H. (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Quart*, **19**:135-138.
- WOELDERS, H., MATTHIJS, A., ENGEL B. (1997). Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medim, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*. **35**:93-105.
- YARNEY, A.T., SANFORD, M.L., PALMER M.W. (1990). Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indicates of postpuerperal reproductive function. *Can. J. Anim. Sci.* **70**:139-147.
- YILDIZ, S. (2004). Koç spermasının farklı antioksidanlar içeren sulandırıcılarla kısa süreli (+5°C) saklanması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- YILDIZ, C., KAYA, A., AKSOY, M., TEKELİ, T. (2000). İnfluence of sugar supplementation of the extender of motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatazoa during freezing. *Theriogenology*. **54**:579-585.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

AD : İlker
SOYAD : Yavaş
DOĞUM YERİ : İzmir
DOĞUM TARİHİ : 04/11/1978
UYRUĞU : T.C.
MEDENİ HALİ : Evli
ASKERLİK DURUMU : Tecilli
İLETİŞİM ADRESİ : Ankara Üniv. Vet. Fak. Dölerme ve Suni Toh. A.B.D. 06110
Dışkapı / Ankara
İLETİŞİM TELEFONU : 0 312 317 03 15 / 292

II-Eğitim

1996–2001 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
1995-1996 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi İngilizce Hazırlık Okulu – Tömer
1989-1995 İzmir Karşıyaka Lisesi [Lise Ve Ortaokul]

III- Mesleki Deneyim

2002 Bahar Döneminden itibaren Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama A.B.D. / ANKARA (Araştırma Görevlisi)
2001 Güz Dönemi Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama A.B.D. Antakya / HATAY (Araştırma Görevlisi)
2001 Yaz Dönemi Farmakoloji Yaz Okulu-ANKARA
2000 Yaz Dönemi Yurt Dışı Stajı-Kibbutz Beit Keshet - Süt ve Besi Sığırcılığı Ünitesi - Lower Gallilee/ İSRAİL
1999 Yaz Dönemi Aydın Hayvan Hastanesi-AYDIN
1998 Yaz Dönemi Efe Veteriner Hizmetleri-AYDIN

IV. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Reprodüksiyon Ve Sun'i Tohumlama Bilim Derneği (Yönetim Kurulu Üyesi)
Veteriner Hekimler Derneği
Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası

V. Bilimsel İlgi Alanları

Yayımları:

UYSAL, O., BUCAK, M. N., YAVAS, I., VARISLI, Ö., GURCAN, S. (2005). Evaluation of Ram Sperm Frozen with Various Taurine Concentrations. *Indian Vet. J.* **82**:1059-1061.

TEKİN, N., UYSAL, O., AKÇAY, E., YAVAŞ, İ. (2006). Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. **53(3)**:179-184.

UYSAL, O., KORKMAZ, T., BUCAK, M.N., YAVAŞ, İ. (2006). Evaluation by hypoosmotic swelling-eosine test of cryopreserved bovine spermatozoa. *Indian Vet.J.* **83**:557-559.

UYSAL, O., VARISLI, Ö., TOSUN, H.; YAVAS, I.; GURCAN, S. (2007). Cryopreservation of canine semen at different freezing and thawing programmes. *Indian Vet. J.* **84**:57-59.

AKÇAY, E., VARIŞLI, Ö., BUCAK, M.N., YAVAŞ, İ., TEKİN, N. (2007). Hindi spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların spermatozoa motilitesi üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. **54(1)**:35-38.

UYSAL, O., BUCAK, M. N., YAVAS, I., VARISLI, Ö. (2007). Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* **6(12)**:1362-1366.

AKÇAY, E, UYSAL, O, YAVAS, I, ARI, U. (2008). The effects of serum, steroid and gonadotropins on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* **7(2)**: 178-183.

Poster ve Tebliğler:

UYSAL, O., DEMİRAL O., AKÇAY, E., YILDIZ S., YAVAŞ, İ. (2002). Dondurulmuş Tavşan Spermatozoasının Farklı Kapasitör Ajanlarla İn Vitro Kapasitasyonu. II. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi. Kongre Tebliğ Özetleri Kitapçığı:34.

LUPERTO, V. A., KOCABAŞ, E., YAVAŞ, İ. (2004). Tavşan Spermasının Farklı Sıcaklık ve sürelerde Dondurulması ve İn Vitro Değerlendirilmesi. VI. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Araştırma Kongresi.

UYSAL, O., BUCAK, M. N., YAVAS, I., VARISLI, Ö. (2004). Değişik Sıcaklık ve Sürelerde Çözdürülen Dondurulmuş Boğa Spermasının İn Vitro Bulgularla Değerlendirilmesi. III. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi. Kongre Tebliğ Özetleri Kitapçığı:75-76.

TEKİN, N., UYSAL, O., AKÇAY E., YAVAŞ, İ. (2004). Koç Spermasının Dondurulmasında Antioksidan ve Soğutma Hızının Etkisi. III. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi. Kongre Tebliğ Özetleri Kitapçığı:79-80.

UYSAL, O., VARISLI, Ö YAVAS, I., BUCAK, M. N., TOSUN H. (2004). Köpek Spermasının Farklı Dondurma/Çözdürme Programlarında Kryoprezervasyonu. III. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi. Kongre Tebliğ Özetleri Kitapçığı:81-82.

YAVAS, I., TEKİN, N. (2007). Sıfat Sezonuna Geçiş, Sıfat Sezonu ve Sıfat Sezonu Dışında Koç Spermasının Gliserolsüz Dondurulabilirliğinin Araştırılması. IV. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi. Kongre Tebliğ Özetleri Kitapçığı:219-220.

AKÇAY, E., UYSAL, O, YAVAS, I., ARI, U. (2007). Sığırlarda İn Vitro Maturasyon Ortamında Serum, Steroid Ve Gonodotropin İlavelerinin İn Vitro Maturasyon Ve Fertilizasyon Üzerine Etkileri. IV. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi. Kongre Tebliğ Özetleri Kitapçığı:34-35.