

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

**İVESİ SPERMASININ BİYO-FİZİKSEL  
KARAKTERİNİN TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Vet. Hek. İbrahim Halil AGAS

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Ömer VARIŞLI

ŞANLIURFA

2014

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

**İVESİ SPERMASININ BİYO-FİZİKSEL  
KARAKTERİNİN TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Vet. Hek. İbrahim Halil AGAS

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Ömer VARIŞLI

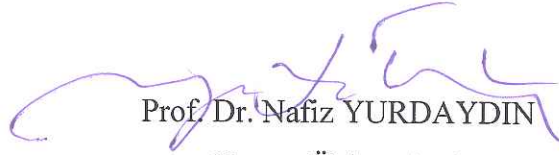
Bu tez, Hr.Ü Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 12183 proje numarası ile desteklenmiştir.

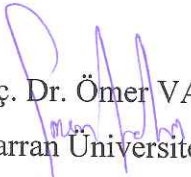
ŞANLIURFA


2014

HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

İbrahim Halil AGAS'ın hazırladığı "İvesi Spermalarının Biyo-Fiziksel Karakterinin Tespiti",  
konulu çalışma, 18/02/2014 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek, Dölerme ve  
Suni Tohumlama Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Nafiz YURDAYDIN  
Harran Üniversitesi  
BAŞKAN

  
Yrd. Doç. Dr. Ömer VARIŞLI  
Harran Üniversitesi  
ÜYE

  
Yrd. Doç. Dr. Birten EMRE  
Harran Üniversitesi  
ÜYE

26/05/2014  
ONAY  
Prof. Dr. Nürten AKSOY  
Enstitü Müdürü



## TEŞEKKÜR

Türkiye’de koyunculuk sektörü; şehirleşmenin artması, sosyal yapının değişmesi, bölgesel güvenlik sorunları, mera alanlarının azalması, yem bitki fiyatlarının yüksek olması ve et fiyatlarında gerçekleşen dalgalanma gibi nedenler ile gerilemektedir. Türkiye koyun varlığı 1991 yılında 40.4 milyon iken günümüzde 27 milyon kadar azalmıştır. Koyunculuk sektörünün yeniden cazip hale gelmesi için verimliliğinin artması gerekmektedir. Bu amaçlar kültür ırkı hayvan sayısının artırılması ve mevcut koyun varlığının ıslahı gerekmektedir. Islah çalışmalarında ise sun’i tohumlama önemli yer tutar. Sun’i tohumlama amacıyla kullanılacak spermanın en iyi şekilde işlenmesi ve korunması gerekir. Yerel ırklarına ait sun’i tohumlama ve sperm işleme tekniklerinin geliştirilmesi ıslah çalışmalarına büyük katkı sağlayacaktır.

Sunulan çalışma, Şanlıurfa’da ivesi spermasının biyo-fiziksel karakterinin tespiti sorunlarını belirleme ve sektöre çözüm önerileri sunma amacıyla yapılmıştır.

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince, yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Ömer VARİŞLİ’ ya, ayrıca Yüksek Lisans eğitimi almamda çok önemli destek ve yardımı olan Döllerme ve Sun’i Tohumlama Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sn. Prof. Dr. Nafiz YURDAYDIN’ a, değerli hocam Sn. Araş. Gör. Dr. Çiğdem ÇEBİ’ ye, tezimin hazırlanmasında bilgi ve deneyimleriyle desteklerini sunan diğer hocalarıma ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline, sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca, her türlü fedakarlığı gösteren, desteğini esirgemeyen aileme ve değerli eşime teşekkür eder sevgilerimi sunarım.

İbrahim Halil AGAS

2014

# İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLolar DİZİNİ.....	V
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Türkiye’de Koyun Varlığı.....	2
2.1.1. Koyunların Sınıflandırılması.....	3
2.2. Türkiye’de Koyun Irkları.....	4
2.2.1. İvesi Koyunun Irk Özellikleri.....	5
2.3. Koyunlarda Biyoteknolojik Yöntemler.....	8
2.4. Koyunlarda Sun’i Tohumlamanın Önemi.....	9
2.5. Koç Spermalarının Spermatolojik Özellikleri.....	11
2.6. Koç Spermalarının Dondurulması.....	13
2.6.1. Koç Spermalarının Dondurulmasında Kullanılan Sperma Sulandırıcıları.....	15
2.6.2. Koç Spermalarının Kısa Süreli Saklanması.....	16
2.6.3. Koç Spermalarının Biyo-fiziksel Özellikleri.....	18
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1. Anisoosmotik Stresin Etkisi.....	20
3.2. 0.5, 1.0, 1.5 M Kryoprotektanların Etkisi.....	20
3.3. Spermaların Değerlendirilmesi.....	20
3.3.1. Motilite Muayenesi.....	21
3.3.2. Akrozom Muayenesi.....	21

3.3.3. Membran Bütünlüğü Muayenesi.....	21
3.4. İstatistiki Analiz.....	21
4. BULGULAR.....	22
5. TARTIŞMA.....	24
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	27
KAYNAKLAR.....	28



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İvesi ırkına ait erkek ve dişi koyun.....	7
Şekil 2. Spermatozoonun yapısı(11).....	12



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Türkiye'de koyun sayısının 1989-1993 yıllarındaki değişim (1000 baş) (TÜİK)...2	2
<b>Tablo 2.</b> Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde km <sup>2</sup> 'ye düşen koyun sayısı.....3	3
<b>Tablo 3.</b> Türkiye'de koyun ırkları (4).....4	4
<b>Tablo 4.</b> İvesi koyunlarının verim özellikleri.....7	7
<b>Tablo 5.</b> Değişik türden hayvanlarda başlıca spermatolojik parametreler ve spermalarının kimyasal bileşimi.....13	13
<b>Tablo 6.</b> Sperm analiz nomenklatörleri(21).....13	13
<b>Tablo 7.</b> Koç sperması dondurulmasında kullanılan sodyum sitrat sulandırıcısı.....15	15
<b>Tablo 8.</b> Sulandırıcılara eklenen şekerlerin dondurma üzerine etkisi.....16	16
<b>Tablo 9.</b> Osmotik stresin sperm motilite, membran bütünlüğü ve akrozom üzerine etkisi...22	22
<b>Tablo 10.</b> Değişik kryoprotektan ve oranlarının sperm motilite, membran bütünlüğü ve akrozom üzerine etkisi.....23	23



## KISALTMALAR ve SİMGELER

°C	: Santigrat Derece
BHT	: Butillendirilmiş hidroksi toluen
CM	: Santi Metre
DİE	: Devlet İstatistik Enstitüsü
DMSO	: Dimethyl Sulfoksid
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPBS	: The Dulbecco's Phosphate-buffered Saline
EDTA	: Ethylenediamine-tetra-acetic acid
EG	: Etilen Glikol
EP	: Equex Past
Gly	: Gliserol
IVT	: Illini Variable Temperature
İV	: İvesi
M.Ö	: Millattan Önce
M	: Mol
Mg	: Milligram
ML	: Milli Litre
MOET	: Multiple Ovulation and Embriyo Transfer
mOsm	: Milliosmollük
nM	: Nano Mol
PBS	: Primer Biliyer Siroz
PG	: Propilen Glikol
PI	: Propidium İodide
PNA	: Peanut Agglutinin
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SOD	: Sudden Oak Death
SPSS	: Statistical Package for Social Science

TİGEM : Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

YS : Yumurta Sarısı

$\mu\text{L}$  : Mikro Litre

$\mu\text{M}$  : Mikro Mol



## ÖZET

### İvesi Spermasının Biyo-fiziksel Karakterinin Tespiti

İbrahim Halil AGAS

#### Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Günümüzde koyunlarda dondurulmuş sperma ile yapılan tohumlamalardan yeterli oranda fertilitite elde edilememektedir. Kryopreservasyon işlemi esnasında spermatozoa değişik oranlarda osmotik basınç ve ısı stresine maruz kalır. Sperma üzerinde oluşan bu olumsuz etkilerin azaltılması için dondurma metotları ve yeni sulandırıcılar denenmektedir. Bu çalışmanın amacı, anizozmotik ortam ve kryoprotektanların ivesi sperması üzerine olan etkisini motilite, membran ve akrozom bütünlüğü yönünden değerlendirilmesidir. Sunulan araştırmada, çiftleşme sezonu içerisinde iki adet ivesi koçtan sun'i vajen yöntemiyle alınan ejakülatlar birleştirilip kullanıldı. Çalışma iki aşamadan oluşmuştur. Birinci aşamada, sperma 75, 150, 225, 325, 425, 600 ve 900±5 milliosmollük (mOsm)/kg sükröz solüsyonuna 5 dakika maruz bırakılıp yeniden osmotik duruma getirildi. İkinci aşamada, sperma 0.5, 1.0 ve 1.5 M gliserol, dimetil sülfoksit, ethilen glikol ve propilen glikol kryoprotektan içeren solusyonlara 5 dakika maruz bırakılıp yeniden osmotik duruma getirildi. Spermalar motilite, membran ve akrozom bütünlüğü yönünden değerlendirildi.

Koç sperma motilitesi anizozmotik stres faktörlerinden önemli derecede etkilendi ( $P < 0.05$ ). Genel olarak sperm akrozom bütünlüğü, anizozmotik ortamdan etkilenmezken, 75 mOsm'lük sükröz solüsyonu akrozom bütünlüğünü önemli oranda düşürdü. Kryoprotektanların eklenmesi ve uzaklaştırılması motilite ve akrozom bütünlüğünü etkiledi ( $P < 0.05$ ). 0.5 M Gly ( $P > 0.05$ ) hariç diğer oranlardaki kryoprotektanlar akzorom bütünlüğünü önemli derecede etkiledi.

Sonuç olarak İvesi koç spermasının çeşitli stres faktörlere karşı geniş direnç aralığı olduğunu göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** İvesi, kryoprotektan, osmotik tolerans, sperma

## **ABSTRACT**

### **Determination of Bio-physical Characteristics of Awassi Semen**

**İbrahim Halil AGAS**

#### **Department of Reproduction and Artificial Insemination Master Thesis**

Effective ram sperm cryopreservation protocols, which would yield acceptable fertility rates following artificial insemination in ewes, are currently lacking. During the process of cryopreservation, spermatozoa are exposed to osmotic pressure and heat stress at different rates. To reduce these negative effects on spermatozoa, new freezing methods and extenders are being tried to develop. The objective of the current studies are to compare the effects of various anisoosmotic conditions, cryoprotective agents on the motility, acrosome and membrane integrity of Awassi sperm. In the mating season, the sperm was collected from 2 Awassi ram than has been mixed and used. Two experiments were conducted. In experiment 1, the sperm was exposed to 75, 150, 225, 325, 425, 600 and 900±5 mOsm/kg sucrose solutions, held for 5 min and then returned to isosmotic condition. In experiment 2, the sperm was exposed to 0.5, 1.0 and 1.5 M glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol for 5 min and then returned to isosmotic condition. The sperm was evaluated by microscopic assessment of the sperm motility, acrosome and membrane integrity.

The motility of ram sperm was significantly affected from anisosmotic stress ( $P < 0.05$ ). While anisosmotic stress had no effects on acrosomal integrity of ram sperm, there was a significant reduction in acrosomal integrity for ram sperm after the addition and removal of a 75 mOsm sucrose solution. The abrupt addition and removal of cryoprotectant had effect on the motility and acrosomal integrity of epididymal ram sperm ( $P < 0.05$ ). There was a decrease in acrosomal integrity for ram sperm after exposure to cryoprotectant ( $P < 0.05$ ) except 0.5 MGly ( $P > 0.05$ ).

In conclusion, the current data suggest that ram sperm is resilient to wide range cryobiologically stress conditions.

**Keywords:** Awassi, cryoprotectans, osmotic tolerance, sperm.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişmekte olan bir ülke konumundaki Türkiye'de bitkisel ve hayvansal üretim ekonomik açıdan önemli yer tutmaktadır. Çünkü ülke nüfusunun yaklaşık %29,5'inin kırsal kesimde yaşamaktadır ve 23 249 000 olan toplam işgücünün 8 222 000'sinin tarım ve hayvancılık kesiminde istihdam edilmektedir. Hayvancılığın gelişmesinde biyo-teknolojik yöntemler büyük önem taşımaktadır. Özellikle sığırlarda boğa spermasının başarılı biçimde dondurulması ve dondurulmuş sperma ile yapılan sun'i tohumlamalardan doğal çiftleştirmeye yakın fertilité elde edilmesi, sığırcılıkta verim gücünde hızlı bir artış olmuş, süt ve et sığırcılığı diğer çiftlik hayvanlarına göre çok daha fazla gelişmiştir. Ancak günümüzde koyunlarda dondurulmuş sperma ile yapılan tohumlamalarda yeterli oranda fertilité elde edilememektedir ve ayrıca uygun bir sperma dondurma protokolü de geliştirilememiştir. Bu durum koyunculukta dondurulmuş sperma ile sun'i tohumlamaların yayılması engellemiş ve genetik ilerleme yavaş kalmıştır. Sığırcılıkta olduğu gibi kültür ırkı (Holştayn, Simental, vb.) yaygınlaşmayıp daha çok yerel ırklar koyunculukta hakim kalmıştır. Güney Doğu Anadolu bölgesinin hakim ırkı İvesi'dir. Bu yüzden koyunculukta ırklar önemlidir ve sperm dondurulmasında da gerek tür gerekse ırk ve bireysel genetik özellik farklılık arz ettiğine inanılmaktadır. Sun'i tohumlamayı sınırlayan etmenlerini aşmak için gerek dişiye ait faktörleri ve gerekse erkeğe ait faktörlerin düzeltilmesi ve sorunlara ait çözüm yollarının üretilmesi gerekmektedir.

Sunulan araştırma ile gliserol gibi kryoprotektan olan DMSO, EG, PG'ların 0.5, 1.0 ve 1.5 M oranında kullanıldığında dondurma işlemi yapılmadan hücreye verdiği hasar tespit edilmiştir. Değişik osmotik ortamların İvesi sperması üzerine etkisi denenerek osmotik güven aralığı tespit edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2. 1. Türkiye’de Koyun Varlığı

Koyun, insanın ilk evcilleştirdiği hayvanlardan biridir. Yabani hayattan uzaklaşıp evcil hayvan halinde insan eli altına giren koyun üzerinde uzun yıllar çalışan insan, büyük değişiklikler meydana getirdi. Bakım ve beslenmesinin kolay olması ve insanlara çok taraflı yararlar sağlaması ile koyun, diğer hayvanlara oranla fazla çoğalarak dünyanın bütün ülkelerine yayılma şansına sahip olmuştur. Türkiye, koyun varlığı açısından dünyanın önde gelen ülkelerinden biridir. Ülkede 1994 verilerine göre 37.541.000 baş koyun bulunmaktadır. Koyun sayısında 1980 yıllarına kadar belirgin bir artış varken, 1980-1994 döneminde %2.19 ve 1989-1993 yıllarında %13.9 oranında bir azalış olduğu gözlemlenmektedir. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, 2011 yılında bir önceki yıla kıyasla, küçükbaş hayvan sayısı %10 arttı. Koyun sayısı 2011 yılı sonu itibariyle 2009 yılına göre %8,4 artarak 25 milyon 31 bin 565 baş oldu. Son yıllarda koyun sayısı artsada bu durum mera alanlarının endüstri bitkileri tarımı lehine azalması, koyun türünün entansifleşmeye yeterince ayak uyduramaması, köyden kentlere olan göçler ve sosyal yapıda meydana gelen değişimlerin etkili olduğu düşünülmektedir (1).

**Tablo 1.** Türkiye’de Koyun Sayısının 1989-1993 Yıllarındaki Değişim (1000 baş)

Yıllar	1989	1990	1991	1992	1993
Sayı	43.647	40.553	40.433	39.416	37.541
Değişim	100	92.9	92.6	90.3	86.0

Koyun varlığının, arazi kullanma durumunun ve hane halkı başına düşen koyun sayısının tarımsal bölgelere göre değişimi Tablo 2’de özetlenmiştir (2).

**Tablo 2.** Türkiye' nin çeşitli bölgelerinde km<sup>2</sup>'ye düşen koyun sayısı

Tarım bölgeleri	Km <sup>2</sup> 'ye düşen koyun sayısı
Orta Kuzey	47.11
Ege	41.66
Marmara	45.25
Akdeniz	27.96
Kuzey Doğu	86.08
Güney Doğu	72.63
Karadeniz	30.79
Orta Doğu	46.15
Orta Güney	68.81

### 2. 1. 1. Koyunların Sınıflandırılması

Koyun, çiftlik hayvanların içerisinde en fazla sayıda ırka sahip bir türdür. Bunun birçok nedeni vardır. Birincisi, koyun dünyanın birçok yerinde evcilleştirilmiştir. İkincisi ise, koyun türünün doğaya en bağımlı hayvan türlerinden birisi olmasıdır. Bir başka deyişle çeşitli coğrafi bölgelerde özel amaçlarla koyun ırkları oluşturulmuştur. Buna bağlı olarak birim verimlilik açısından diğer hayvan türlerine göre örneğin sığır ve tavuğa göre geri oluşu, çevrenin ıslahı yerine var olan çevre koşullarına uyabilen yeni tip ve ırkların oluşturulmasını gündeme getirmiştir. Diğer yandan insanların koyundan beklentileri zaman süreci içinde değişime uğramış, salt yapağıcı tipleri yerine etçi ve sütçü tipler türetilmiştir. Koyunların sınıflandırılması birçok açıdan yapılabilir. Bunlar arasında yapağı özelliklerine göre sınıflandırma, kuyruk yapısına göre sınıflandırma sayılabilir. Bununla birlikte günümüzde en yaygın olarak kabul edilen sınıflandırma şekli yararlanma yönüne göre yapılan sınıflandırmadır (3).

## 2. 2. Türkiye’de Koyun Irkları

Koyunlarda en az iki verim özelliğinin bir arada olması arzu edilir. Koyunları verimlerine göre 3 grupta toplayabiliriz;

- Etçi ırklar
- Sütçü ırklar
- Yapağıcı ırklar

Yerli koyun ırklarımız verim yönünden kültür koyun ırklarına göre daha düşük seviyededirler. Ancak çevreye uyum ve damızlık temini yönünden kültür ırklarına tercih edilmektedir. Bu nedenle saf kültür ırkı koyunlar getirmek yerine yerli ırklarımızın melezleme yoluyla veya seleksiyonla verimlerini artırmaya çalışmak daha doğrudur. Yurdumuzda koyunların belirli yönde verim özellikleri gelişmediğinden sınıflandırmayı kuyruk yapılarına göre yapmak daha uygundur. Koyunlarımız kuyruk yapılarına göre 2 grupta toplanabilir (4).

**1-Yağlı kuyruklu olanlar;** Anadolunun iç kısımlarında yaygındır. Akkaraman, Morkaraman, Dağlıç ve İvesi gibi. Yağlı kuyruklu koyunlar ne kadar iyi beslenirse kuyrukları o kadar büyür. Koyun, yemin bol olduğu dönemlerde kuyruğunda yağ depolar. Yemin yetersiz olduğu kış dönemlerinde bu yağı harcayarak yaşamını sürdürür. Bütün yerli koyun ırkları içerisinde, kuyruğu en büyük olan ırk Morkaramandır.

**Tablo 3.** Türkiye'de koyun ırkları (4)

Koyunun Irkı	Sayısı	%	Yetiştirme Bölgesi
<b>Yağlı Kuyruklu Irklar</b>			
Akkaraman	12.950.000	44	Orta Anadolu
Morkaraman	6.475.000	22	Doğu Anadolu
Dağlıç	3.533.000	12	Orta ve Batı Anadolu
İvesi	1.177.000	4	Güney Doğu Anadolu



## İnce ve Uzun Kuyruklu Irklar

Kıvırcık	1.776.000	6	Ege ve Marmara
Karayaka	883.000	3	Karadeniz
Sakız	65.000	-	Ege
Türk Merinosu	875.000	3	Marmara, Orta Anadolu
Diğerleri	1.711.000	6	Değişik Bölgeler
<b>Toplam</b>	<b>29.435.000</b>	<b>100</b>	

**2-İnce ve uzun kuyruklu olanlar;** denize yakın bölgelerde yaygındır. Kıvırcık, Sakız, Karayaka ve Türk Merinosu gibi.

Koyun varlığımızın %90' dan fazlasını yerli ırklar oluşturmaktadır. Bu koyunlar genellikle yağlı kuyruklulardır (4).

### 2. 2. 1. İvesi Koyunun Irk Özellikleri

İvesi koyunları 5-8 ayda; koçları ise 5 ayda pupertasa ulaşır. Kızgınlık mevsimi Haziran sonunda başlayıp Ağustos'ta en yüksek seviyeye ulaşır. Ekim-Kasım ayına kadar devam eder. Ancak selekte edilmiş sürüler 1-2 ay önceden kızgınlığa gelebilirler. Erkekler 5. ayda pupertasa erişir ve 7. aydan itibaren testislerinde spermatozoa üretimi başlar. Testis ölçülerinde en hızlı büyüme 9 ve 10. ayda gözlenir. Azami testis ağırlığına ise 11-12. aylarda ulaşır. Koçlarda sperma miktarı, bahar aylarında düşük, üreme mevsimi olan yaz aylarında ise en yüksek seviyeye ulaşır. Koyunculukta çiftleştirme mevsimi yavrunun erken doğmasını sağladığı için önemlidir. Erken doğan yavrular soğuk ve yağışlı havaya göre daha çok stres faktörü olan sıcak mevsimden daha az etkilenerek (5) daha hızlı gelişim gösterebilirler.

Türkiye'de 2012 Yılı verilerine göre, yaklaşık 25 milyon koyun bulunmakta ve bunların büyük bölümü yerli ırklardan oluşmaktadır. Bölgesel olarak 2012 Yılı sayımlarına göre, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde 4.4 milyon olan koyun varlığının 1.4 milyonu Şanlıurfa ilindedir (6). İvesi koyunları, Güneydoğu Anadolu bölgesinin step şartlarına adapte olmuş ırklardan birisidir. Bu koyunlar bölgede yetiştirilen en yaygın ırk olmasına rağmen

ekstansif yetiştirme şartlarında bile ancak 100-150 kg kadar süt verebilmektedir. Diğer taraftan TİGEM ve Araştırma Enstitülerinde yapılan seleksiyon çalışmaları sonucu 300-350 kg süt verebilen elit sürüler de oluşturulmuştur. Seleksiyon projesine uzun yıllar önce başlayan İsrail’de ise 1937 yılında 130 kg olan laktasyon süt verimi günümüzde 500 kg’a çıkartılmıştır (5, 7).

İvesi ırkı koyunlar; vücutları sağlam ve orta yapılıdır. Süt tipine uygun, ince fakat sağlam kemik yapısına sahiptir. Vücut beyaz-krem renklidir. Baş, kirli sarı- kahverengi, siyah ve beyaz olmak üzere üç farklı renkte olabilir. Çoğunlukla alında beyaz leke vardır. Kulak ve burunda lekeler ile ayaklarda pigmentasyon bulunur. Yağlı kuyrukludur. Büyük, yağlı esas kuyruk kitlesinin üzerinde yağsız bir parça bulunur. Kuyruğun yağlı bölümünde alttan başlayıp ortaya kadar uzayan çıplak bir oyuk bulunur. Erkeklerde boynuzlar geriye, aşağıya doğru ve helezoni yapıdadır. Boynuzsuz ve hilal şeklinde boynuzlulara da rastlanır. Dişilerde %10 oranında zayıf boynuz ve koç boynuzluluk görülür. Meme; yüksek süt verimine uygun şekilde bezel yapıdadır. Meme ve meme başı formu değişkendir (1).

İvesi ırkı koyunlara ait ayırıcı özellikleri; sıcak ve kurak iklim koşullarına çok iyi uyum sağlamıştır. Bu koşullarda uzun mesafeleri yürüyebilir. Analık iç güdüsü gelişmiştir. Değişik çevrelere uyum yeteneğinin yüksek ve sürü iç güdüsünün gelişmiş olması, İvesi’lerin diğer sütçü ırklara üstünlüğü olarak kabul edilir. İsrail İvesi’lerinin kökeni Anadolu İvesisi’dir (1).

İvesiler göçer sistem içinde yetiştirilir. Sıcak ve kurak iklim hayvanı olmakla birlikte değişik çevre koşullarına adaptasyon yeteneği iyi olup soğuk karasal iklim koşullarında bile başarıyla yetiştirilebilmektedir. İvesiler, 40-45°C’leri bulan sıcak ve kurak çöl şartlarında sürü koyuncululuğu şeklinde yetiştirilebilmektedir. Yetersiz mera, barınak, bakım ve besleme koşullarında yetiştirilebilir. Besleme kış dönemi dışında mera ve anız otlatmasına dayalıdır. Kış aylarında ağırlıklı olarak samana dayalı, az miktarda dane destekli besleme uygulanır. Yetersiz, basit ve düşük maliyetli ağıllarda barındırılır. Yağışlı ve nemli bölgelerde adaptasyon gücü güçlüdür (1).



**Şekil 1:** İvesi ırkına ait erkek ve dişi koyun

Dış yapı özellikleri olarak; vücut beyaz yapağı ile örtülüdür. Baş boyun ve ayaklar kahverengi, kirli sarı ya da siyah renkli olabilir. Ancak yaygın renk kahverengidir. Baş, dışa doğru çıkıntılıdır. Bir başka deyişle koç burunluluk egemendir. Kulaklar uzun ve sarkıktır. Kuyrukları tek parçalı, yuvarlakça uç kısmı yukarıya doğru kıvrık, Akkaramana oranla daha kısa ve geniştir. Koçların çoğu spiral boynuzludur. Koyunlar ise genellikle boynuzsuzdur. İvesilerin yapağısı kaba karışık niteliktedir. Yerli ırklar içinde yapağısı en kaba olan ırklardan biridir. İvesi, en iri yerli ırklardan biridir. Koyunların ortalama cidago yüksekliği 65-68 cm'dir (1).

**Tablo 4.** İvesi koyunlarının verim özellikleri

<b>Verim özelliği</b>	<b>Ortalama</b>
İkizlik	%5-10
<b>Canlı ağırlık</b>	
Koyun	35-40 kg
Koç	60-70 kg
<b>Laktasyon süt verimi</b>	
Kırsal koşullarda	100-150 kg
İslah edilmiş sürülerde	250-300 kg
Laktasyon süresi	6-7 ay
Kirli yapağı verimi	1.5-2.0 kg
Lüle uzunluğu	11-16 cm
İncelik	32-35 mikron

İvesi ırkı koyunlar iyi bakım ve besleme koşulları altında bir laktasyonda ortalama 180-200 kg süt verebilmektedir. Süt verimi bazı koyunlarda 400 kg dolayında olabilmektedir. İvesi koyunlarının büyüme yeteneği diğer yerli ırkların kuzularından iyidir. İvesi genellikle saf yetiştirilen bir ırktır. Ancak bu ırkın koçları, Akkaraman ve Morkaraman koyunları ile birleştirilerek bu ırkların süt verimlerinin artırılması amacıyla kullanılmaktadır (1).

### **2. 3. Koyunlarda Biyoteknolojik Yöntemler**

Hayvansal üretimin artırılmasında kullanılan biyotekniklerle artık yetiştiricilikte östrus senkronizasyonu, embriyo transferi ve cinsiyet ayrımı yapılabilmekte, hatta son yüzyıla damgasını vuran canlıların benzerinin oluşturulması yani kopyalama gerçekleştirilmiştir (8). Biyoteknoloji ve genetik mühendisliği çoğu zaman aynı anlamda kullanılır. Oysa genetik mühendisliği genetik materyaldeki çeşitlendirmeleri ve değişiklikleri ifade ederken, biyoteknoloji; biyolojik bir sistemin yada yapının endüstriyel boyutta kullanılması yoluyla üretim anlamına gelir. Biyoteknoloji, gen mühendisliği yöntemlerini sadece bir araç olarak kullanır. Bu yolla transgenik hayvanlar elde edilmiştir. Genetik olarak üstün hayvanlar elde etmek için hayvancılıkta ekonomik üretimi etkileyen en önemli faktörlerin başında döl veriminin iyileştirilmesi gelmektedir. Hayvan yetiştirme programında çoklu yumurta ve embriyo transferi (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) istenilen genetik ilerlemeyi arttırdığı ve generasyonlar arası süreyi kısalttığı bildirilmektedir (9). X ve Y kromozomu yönünden belirlenmiş spermaların veya embriyoların sun'i tohumlama endüstrisinde sağlayacağı ekonomik yararlar oldukça önemlidir. Çünkü bu yolla süt sığırcılığı yapan işletmeler dişi buzağı, et sığırcılığı yapan işletmeler erkek buzağı üretimini hedefleyeceklerdir. Erkek veya dişi yavru oluşumunu belirleyen spermatozoidlerdir. Bu konu ile ilgili yöntemler iki sperma hücresi tipinin büyüklük ve yoğunluk bakımından birbirinden farklı olmasına dayanmıştır. X ve Y kromozomu taşıyan spermalar flow sitometrik yöntemle DNA içeriklerine göre (Sığırlarda X kromozomu Y kromozomundan %2.8 daha fazla DNA içermektedir) başarıyla birbirinden ayrılmıştır (10). Fare spermalarında X kromozomu ayırmadan sonra yapılan tohumlamalarda döllerin %94'ü dişi; Y kromozomuna göre yapılan ayırmalardan sonra yapılan tohumlamalarda döllerin %81'i erkek olmuştur (9).

## 2. 4. Koyunlarda Sun'î Tohumlamanın Önemi

Sun'î tohumlama erkek hayvanlardan alınan spermaların değişik tekniklerini kullanarak, dişi hayvanlara nakledilmesi şeklinde kabaca tanımlanabilir. Sun'î tohumlama; bilimsel, teknik ve hekimlik bilgilerinin uygun teknoloji ile donatılmış bir organizasyonda kullanılması demektir. Sun'î tohumlamanın istenilen ölçüde başarılı olabilmesi için spermanın uygun tekniklerle erkek hayvanlardan alınması, muayenesi ve değerlendirilmesi ile sağlıklı hayvanlara uygun zamanda nakledilmesi gerekir. Hemen her hayvan türünde uygulanabilen sun'î yada yapay tohumlama daha çok ekonomik verimleri için yetiştirilen hayvan yetiştiriciliğinde büyük organizasyonlar yapılarak uygulanmaktadır. Özellikle dondurulmuş spermanın uygulamaya alınması erkek damızlıkların seçimi ve değerlendirilmesinde büyük ilerleme sağlamıştır. Böylece, yetiştirme hijyeninin sağlanması ve genetik kapasitenin artırılması ile döl verimi ve yavru verimlerinde büyük artışlar ve denetim sağlanabilmiştir. Sun'î tohumlama ile başlatılan çalışmalar günümüzde bilimsel ve teknolojik ilerlemeler ışığında reproduktif biyoteknolojinin oluşmasına yol açmıştır (8).

Türkiye'deki hayvan popülasyonlarının verim güçlerinin istenilen düzeyde olmaması bu hayvanlarda ıslah çalışması ile verim kabiliyetlerinin yükseltilmesini zorunlu kılmaktadır. Hayvansal ürünlerin elde edilmesi ve artırılmasında birçok yöntem vardır. Bunlar arasında et vb. ürünleri ile canlı hayvan materyalinin ithal yoluyla sağlanması, mevcut hayvanların seleksiyonu (saf yetiştirme), verim güçlerinin artırılması, düşük verimli hayvanları yüksek verimli hayvanlarla dölleyerek (çevirme melezlemesi) verim güçlerinin artırılması, reproduktif biyoteknikleri kullanarak yerli hayvanlardan verim kabiliyetleri yüksek hayvanlar elde edilmesi sayılabilir. Ancak yöntemlerin gerçekleşme oranı, ekonomisi, çalışmaların sürekliliği ve kalıcılığı düşünüldüğünde mevcut hayvan popülasyonunun melezleme yöntemiyle istenilen verim gücüne çıkartılması çalışmaları daha gerçekçi olmaktadır. Türkiye'de de bu yönetim seçilmiş olmasına rağmen zaman zaman diğer yöntemlerinde denendiği örneğin; hayvansal ürün ve canlı hayvan ithali yoluna gidilmesi kolay ve hızlı gerçekleşme savlari olarak gözlenmektedir. Her ne kadar hayvanların genetik kapasiteleri yapılan çalışmalarla yüksek hale getirilebilirlerse de mevcut genotipe bağlı üretimin elde edilmesi ancak uygun çevre koşullarına bağlıdır. Aksi takdirde beklenen verim gücünün kaçınılmaz olarak altında kalınır. Türkiye'de yapılan ıslah çalışmalarında başta besleme,

çevre koşulları, barınak ve bakım olmak üzere göz ardı edilmiştir. Özellikle ithal damızlıklarda başta döl verimi olmak üzere yeterli besleme, barınak ve bakım koşulları oluşturulmadığı için istenilen verimler alınamamıştır. İthale dayalı damızlık yetiştirmede bir diğer önemli olumsuzlukta dışarıdan getirilen damızlıkların Anadolu koşullarında hastalıklara karşı yeterli bağışıklık mekanizmalarına sahip olmamaları nedeniyle kısa sürede telef olmaları yada hastalıklı oldukları için beklenen verimleri ortaya koyamamalarıdır. Açıklanan nedenlerden, Türkiye’de en akılcı ve verimli yolun sun’i tohumlama yöntemiyle her şeyin teoride olduğu gibi gerçekleşeceği de sanılmalıdır. Sun’i tohumlama yöntemiyle etkin ve başarılı sonuçların alınabilmesi her şeyden önce uygun bir organizasyonun olmasına bağlıdır. Bu organizasyonda yeterli uzman elaman, uygun alt yapı, besleme, bakım gibi çevre koşullarının yanı sıra kayıt sisteminin olması ve verim kontrollerinin yapılması gerekir. Yukarıda ana hatlarıyla açıklanan koşulların oluşması halinde bile uygun nitelikte erkek damızlıkların olmaması istenilen başarıyı sağlayamaz. Sun’i tohumlamanın başarılı olabilmesi için dişi damızlıklardan öncelikle yeterli döl verimi alınabilmelidir. Döl verimi üzerinde birçok faktör etkili olsada daha çok hastalıklar olumsuz etki yapar. Popülasyonda damızlık dışının sağlıklı olması, daha da önemlisi çok sayıda dişiyi dölleyen erkek damızlığın hastalıklardan arı ve istenen genetik kapasitede olması gerekir. Bu nedenle sun’i tohumlama uygulamalarında sperması kullanılan damızlıklar öncelikle her türlü hastalıklardan arı yetiştirilmiş, özellikle yetiştirme hastalıkları yönüyle sürekli kontrol altında tutulmuş, istenilen genetik kapasitede ve döllere genetik özelliklerini aktarabilir olmalıdır (8).

Türkiye koyun ırklarının genetik ıslahı doğrultusundaki çalışmalar, ağırlıklı olarak kamu kurumları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmalarda, araştırmacılar başlıca iki konu üzerinde durmuşlardır. Bunlardan birincisi; gerek doğa ve iklim koşulları, gerekse işletme yapıları ve pazar taleplerinin ayrı oluşu, bütün koyunculuk işletmelerinde aynı ırkın ya da aynı tipin yetiştirilmesine uygun olmayışı gerçeğidir. Bu nedenle ıslah çalışmalarında, çeşitli genetik yapılarda damızlık örnek üretmek gündemdeki ilk konu olmuştur. Türkiye koyunlarının ıslahında yüksek damızlık değere sahip genetik materyale gereksinme vardır. Türkiye’de yerli koyun ırklarımızın düşük olan verimlerinin ıslahında izlenen yol genellikle melezleme olmuştur. Kamu yetiştirme kurumlarında elde edilen bu tiplerin uygulamaya aktarılması gerekmektedir. Bu nedenle üniversiteler, araştırma kurumları, yayımcı ve yetiştiriciler arasında bir eşgüdümün olması zorunludur (11).

Sığırlarda dondurulmuş sperma ile yapılan sun'i tohumlama, başarıyla ve yaygın biçimde uygulanmaktadır. Koyunlarda ise dondurulmuş sperma ile yapılan tohumlamaların gerek yöntemin güçlüğü ve gerekse fertilité oranlarının düşüklüğü (dondurulmuş sperma ile intrauterin olarak tohumlanan koyunlarda %48, trans-servikal tohumlamada %32, servikal tohumlamada ise %9'luk gebelik oranları elde edildiği bildirilmiştir)(12, 13) sebebi ile sığırlarda olduğu gibi sun'i tohumlama yaygınlaşmamıştır. Bu sebeple koyunculukta dondurulmuş sperma yerine, %60 ve üzerinde gebelik oranları elde edilebilen nativ veya kısa süreli saklanmış sperma ile tohumlama daha yaygındır (14, 15). Kısa süreli saklama da görülen en büyük güçlük ise 24 saati geçen sürelerde günlük %10-35 arası spermada meydana gelen fertilité kayıplarıdır. Sperma bir haftaya kadar motil kalabilse de fertilité gücü oldukça düşmektedir (16, 14). 24 saatlik saklama sonrası yapılan servikal tohumlamalardan %58-63 arası fertilité oranları elde edilebilir (17).

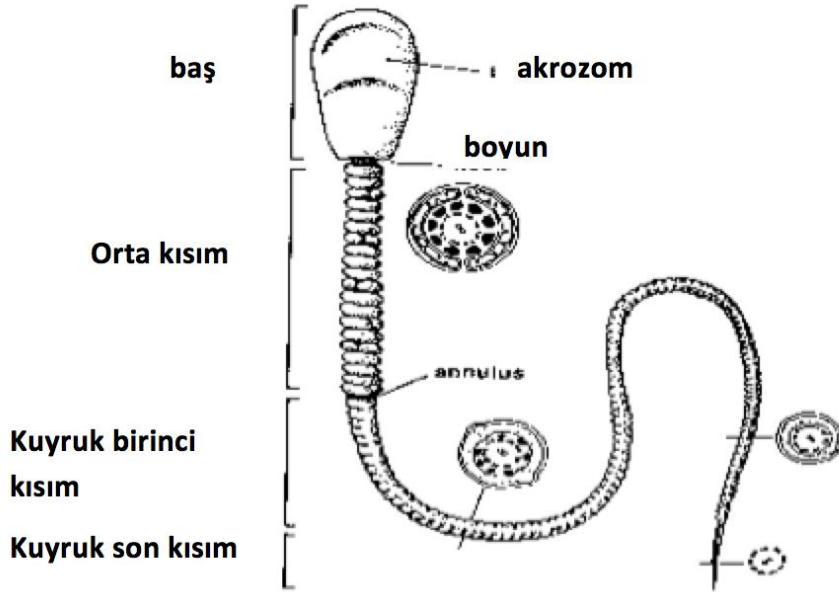
## 2. 5. Koç Spermalarının Spermatojistik Özellikleri

Sperma veya semen, spermatozoonların ile testis ve epididimisin salgısının, ejakülasyon sırasında eklenti bezlerinin (prostat, seminal veziküller ve bulboüretal) salgılarının birleşmesiyle oluşur (18).

Erkek gameti olan spermatozoon spermatojenezis sonucu oluşan ve genetik materyali taşıyan tek bir hücredir. Memeliler ve kanatlılarda farklılık gösteren biçimi üç bölümden oluşur. Akrozom ve nükleusu taşıyan baş kısım, sentriol halkaları ve mitokondrium sarmalını taşıyan orta kısım ve hareketi sağlayan kuyruk kısmıdır (19). Tek bir spermatozoanın 2.0-2.5X10<sup>-8</sup> mg kuru ağırlıkta ve 11-13X10<sup>-8</sup> mg yaş ağırlıktadır. Spermatozoanın yaklaşık uzunluğu 68 µ'dur. Baş 8-10 µ ve kuyruk 50 µ'dur. Hacmi ise 80 µ<sup>3</sup>'dür.

**Plazma Membranı:** Spermatozoanın hücre membranı elektron mikroskobu ile incelendiğinde baş kısmının iki tabakalı bir membran ile sarılı olduğu görülür. Nükleus yine aynı şekilde gözenekli ve çift cidarlı membrana sahiptir. Sperma hücresinin başını saran hücre membranı aynı zamanda kuyruğu da çevreleyerek bütün hücreyi kaplar. Hücre membranı lipid, fosfolipid, kolesterol, proteinden oluşmaktadır ve 75-80 Å kalınlığındadır.

**Baş:** Hücre membranı, nukleus, apikal vakuol, akrozomal kap, post nuklear kap, bazal yumru ve implantasyon çukurluğundan oluşur. Nükleusun %45'i DNA'dan oluşmuştur. Kromozom ve genleri içerdiğinden kalıtsal özellikleri nesilden nesile geçiren kısımdır. Diğer %55'i özellikle arginin gibi amino asitlerden kurulu proteinler teşkil eder.



**Şekil 2.** Spermatozoonun yapısı (20).

Baş, bir fırm küreği gibi yassı ve iç bükeydir. Baştta bulunan akrozom çift membranlı olup, başın 2/3 ünü kapsar. Akrozom, spermatozoon'un ovum örtülerini geçebilmesi için gerekli acrosin, hyolorinidaz ve hydrolitic enzimlerle fertilizasyonda zona pellucidayı delmeye yarayan enzimleri üretir ve içerir. Akrozom tahribi durumunda fertilizasyon gerçekleşmez.

**Orta Kısım:** Orta kısım kuyruktan daha kalındır. İçerisinde mitokondrialar, sentriol halkaları ve fibriller bulunur. Centriol motilitenin kontrol merkezidir. Orta kısmın etrafı mitokondrial bir helix ile çevrilidir. Mitokondrialar spermatozoitin metabolik merkezidir.

**Kuyruk:** Kuyruk spermatozoitin hareketini sağlar.



**Tablo 5.** Değişik Türden Hayvanlarda Başlıca Spermatolojik Parametreler ve Spermalarının Kimyasal Bileşimi.

<b>Spermatolojik özellikler</b>	<b>Koç</b>
Ejakülat miktarı (ml)	0.8-1.2
Spermatozoa yoğunluğu (milyon/ml)	2000-3000
Bir ejakülatta toplam spermatozoa miktarı (milyar)	1.6-3.6
Motilite (%)	60-80
Morfoloji normal sperm (%)	80-95
Protein (g/100ml)	5.0

**Tablo 6.** Sperm Analiz Nomenklatörleri (21).

<b>Parametreler</b>	<b>Değerlendirme kriteri</b>	<b>Nomenklatör</b>
Miktar	Yok	Aspermi
	Az	Hyospermi
	Yüksek	Hyperspermi
Sperm yoğunluğu	Sıfır	Oligozoospermi
	Normal	Normozoospermi
	Yüksek	Polyzoospermi
Motilite	Düşük	Asthenozoospermi
ölü/canlı	Hepsi ölü	Necrozoospermi
Anormal sperm	Yüksek oranda	Teretozoospermi

## **2. 6. Koç Spermasının Dondurulması**

Koç spermasının dondurulması ve dondurulmuş spermalarla ilk sun'i tohumlama uygulamaları Sovyetler Birliği'nde başlamış, sonra Avrupa ülkelerine geçmiştir. Türkiye'de ise Cumhuriyet'in ilk yıllarında başlatılan koyun ıslahı çalışmaları ve sun'i tohumlama günümüzde henüz istenen başarıya ulaşamamıştır. Türkiye, 26.972.000 koyun varlığı ile hayvancılık sektörü içinde önemli bir yere sahipken, verim açısından aynı düzeyde olduğu söylenemez. Bunun çeşitli nedenleri olmakla birlikte henüz koç spermasının başarıyla

dondurulamaması ve koyunlarda sun'i tohumlamanın etkin yapılamaması sayılabilir. Bununla beraber dondurulmuş koç sperması ile son yıllarda geliştirilmiş olan laparoskopi yardımıyla intrauterin tohumlama yöntemi uygulamalarından oldukça iyi sonuçlar alınmaktadır. Ancak bu tohumlama yönteminin büyük koyun sürüleri için pratik ve ucuz olmaması, uygulama zamanının uzun sürmesi ayrıca embriyonik ölümlere yol açması gibi olumsuzlukları vardır. Bu nedenle araştırmacılar koça ait faktörlere yönelmiş, koç spermasını dondurma teknik ve yöntemleri üzerinde yoğunlaşmışlardır (22).

Kryoprezervasyon; koç spermasının spermatozoa motilitesini düşürmesi yanında, spermatozoonun plazma membranı ve akrozom bütünlüğünün bozulmasına da yol açmaktadır. Son yıllarda doğal olarak epididymis ve seminal plazmada yüksek konsantrasyonlarda bulunan hypotaurin, inositol, prolin, askorbik asid, alfa-tokoferol, BHT, desferal, SOD, katalaz ve sulfonik bir amino asit olan taurin gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilerek antioksidan özelliği olan maddeler in vitro koşullarda koç spermasının kısa ve uzun süreli saklanması için lipid peroksidasyona karşı spermatozoa motilitesini ve spermatozoanın membran bütünlüğünü korumaktadır.

Uysal ve ark. (23) farklı antioksidanlarla dondurdukları koç spermalarından çözündürme sonrası en yüksek spermatozoa motilitesini %62.83 ve en düşük anormal spermatozoa oranı %15.83 ile ölü spermatozoa oranını %32.77 50 mM taurin bulunduran Hepes sulandırıcısıyla elde etmişlerdir (23).

Koç spermasının dondurulmasında şimdilerde üzerinde en çok çalışılan konu; sperma sulandırıcıları ve içerisine katılan antioksidan maddeler dışında, optimum dondurma protokolünün ortaya konması ile koç spermasının dondurma ve çözündürme işlemlerine karşı dayanıklılığı bireyler arasında ve ırka bağlı farklılıklar göstermiştir (22).

Anel ve ark. (24) koç spermalarını klasik yöntem olan sıvı azot buharında ve programlanabilir cihazla (-0.2°C / dakika soğutma hızı ile 5°C'den -20°C'ye ve -20°C/dakika soğutma hızı ile -20°C'den -100 °C'a) olmak üzere iki yöntemle dondurmuşlar ve en yüksek spermatozoa motilitesi ve plazma membran bütünlüğünü soğutma hızının programlanmasıyla elde ettiklerini söylemişlerdir.

Byrne ve ark. (25) ise 5°C /dakika soğutma hızı ile 5°C'dan -25°C'a (hızlı) ve 0.5°C/dakika soğutma hızı ile 5°C'dan -25°C'a (yavaş) soğutarak dondurdukları koç spermalarında in vivo ve in vitro fertilizasyon sonuçlarına göre hızlı dondurma protokolü ile yavaş dondurma yönteminden önemli ölçüde daha yüksek dölverimi aldıklarını söylemişlerdir.

### 2. 6. 1. Koç Spermaları Dondurulmasında Kullanılan Sperma Sulandırıcıları

Koç spermalarının doldurulmasına ait bilgi 1937 yılında Bernstein ve Petropavlovsky tarafından verilmiştir. 1950'lerde koç spermalarının doldurulması konusunda oldukça ilerleme sağlandı. Ancak fertilité çok düşük kalmıştır. Günümüze kadar boğa spermalarında kullanılan prosedürler koçlara uygulanmıştır ancak istenen başarı sağlanamamıştır. Koç spermaları ayrı düşünülerek spesifik sulandırıcı ve prosedür geliştirilmelidir (14).

**Tablo 7.** Koç Spermaları Dondurulmasında Kullanılan Sodyum Sitrat Sulandırıcısı

Karışım	Miktar
Sodyum sitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	2.37 gr
Yumurta sarısı	20.0 $\text{cm}^3$
Damıtık su	100.0 $\text{cm}^3$
Gliserol	%7
Glikoz	0.8 gr

Sperma dondurulması veya kısa süreli saklanması amacıyla çok sayıda sulandırıcı geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları yaygın biçimde kullanılırken, bazıları araştırma boyutu ile kalmıştır. Bunlardan bazıları;

- Süt sulandırıcıları
- Tris sulandırıcıları
- Yumurta sarısı – tris – fruktoz sulandırıcısı
- Yumurta sarısı – glikoz – sitrat sulandırıcısı
- Tyrode sulandırıcısı
- Ringer sulandırıcısı

- Merc sulandırıcısı
- Yumurta sarısı- fosfat sulandırıcısı
- IVT (Illini Variable Temperature) sulandırıcısı

**Tablo 8.** Sulandırıcılara eklenen şekerlerin dondurma üzerine etkisi

Referans	Sulandırıcı	% gebelik
Kalev et al. 1969	Glukoz-sodyum sitrat	32.0
Kalev, 1970	%3 Glucose-%2.5sitrat, %7 glycerol	24.0
Kareta, 1972	Fruktose-sitrat- %11 yumurta sarısı	49.6
Colas, 1972	%75 lactose , %20 yumurta sarısı	57.3

## 2. 6. 2. Koç Spermalarının Kısa Süreli Saklanması

Koyunculukta, tohumlanacak sürülerin büyük ölçekli oluşu ve uzak mesafelerde yetiştiriciliğinin yapılması, spermanın buralara sorunsuz ve fertilitate gücünü kaybetmeden ulaştırılması gereğini doğurmaktadır. Ayrıca koçlardan daha fazla sürede ve yılın değişik zamanlarda yararlanmak için sperm saklama teknolojilerinin geliştirilmesi gerekiyor. Sperm saklamada temel mantık spermatozoa metabolizmasını azaltarak veya durdurarak daha uzun yaşamasının sağlanmasıdır. Bu amaçla spermalar düşük ısılarında (4-22 °C, kısa süreli saklama) veya dondurularak (-196 °C, uzun süreli saklama) saklanmaktadır (26, 14). Kısa ve uzun süreli saklama; spermanın taşınması, genetik depolama ve medikal amaçlı kullanılmaktadır (27). Kısa ve uzun süreli saklama metotlarının başarısı ise genel olarak; saklama ısı, soğutma hızı, sulandırıcıların kimyasal yapısı, reaktif oksijen türleri (ROS) ve seminal plazma kompozisyonuna bağlıdır (28, 27). Kısa süreli saklama oda ısısında (18-22 °C) ve soğuk ortamda (4 °C) yapılmaktadır. Bu amaçla; tampon, şeker, yumurta sarısı, glisin ve diğer kimyasallar içeren çok sayıda sulandırıcı geliştirilmiştir (29). Sulandırıcıların başarısı; ortam pH'sını sabitlemesi, uygun ozmotik basınç oluşturması ve gerekli enerji desteği sağlamasına bağlıdır (30). Sulandırıcılar için, benzer özelliğe sahip pH tampon kimyasalı olarak; Tris, N-Tris (hydroxymethyl)-methylaminoethane sulfonic acid (TES), 2(N-morpholino) ethane sulfonic acid (MES), HEPES ve phosphate kullanılmaktadır (31). Genel olarak kısa süreli

saklamada; laktoz, TES-Tris, Tris-citrate ve süt bazlı sperma sulandırıcıları kullanılmakta olsada (28, 14) sulandırıcının en iyi kimyasal bileşeni türlere göre değişiklik arz etmektedir (32). En yaygın olarak kullanılan tampon sulandırıcılardan TL-HEPES ve PBS sperm işleme (33, 34) ve kısa süreli saklamada (35) etkinliği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Tris-citrate yaygın olarak kullanılan bir sulandırıcıdır (36) ve sperm-extender çalışmalarının kontrol grubu için kullanılmaktadır. TES sulandırıcısı, rat spermasının dondurulmasında ve 4 °C’de ekulibrasyonda, spermayı soğuk şokuna karşı korumada etkili olduğu tespit edilmiştir (37).

Spermanın uzun ve kısa süreli saklanmasında yaygın olarak kullanılan yumurta sarısı (YS) spermatozoa membranını soğuk şokuna karşı korur ve membranda bulunan fosfolipidlerin kaybolmasını önler veya restore eder. Yumurta sarısı, içerdiği proteinler, vitaminler, fosfolipidler, glukoz ve antioksidanlar sayesinde membran koruyucu bir etkiye sahiptir (38). Yumurta sarısı içerisine katılan STM-Past gibi deterjanların yumurta sarısının etkisini artırdığı bildirilmektedir (39).

Sperm saklamada kullanılan sulandırıcıların etkinliğini artırmak amacı ile değişik kimyasal maddeler katılmaktadır. Bunlardan biriside Equex Past tır. Equex Past (EP) ve Orvus ES Paste, sodium dodecyl sulfate (SDS)’ın ticari formu olup, suda çözünen anyonik bir deterjandır. Özellikle yumurta sarısı ile birlikte kullanıldığında, spermada meydana gelen donma hasarı ve soğuk şokuna karşı koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (40). Equex pastın Assaf koç spermalarının kryopreservasyonuna olumlu katkılar sağladığı bildirilmiştir (41). Equex past, yumurta sarısının yapısında bulunan lipoproteinlerin yapısını değiştirerek etkinliğini artırmaktadır (42). EP sperma kryopreservasyonu amacı ile %0.5-1.5 arasında sulandırıcılara eklenmektedir. Rat sperması üzerine yapılan çalışmalarda, santrifüj işlemi uygulanmış yumurta sarısı ile EP’nin + 4 °C’de kısa süreli saklamada bir etkisine rastlanmazken, sperma inkübasyonunda olumlu etkisinin olduğu saptanmıştır (34). Kedilerde dondurma işleminde akrozom bütünlüğünü koruduğu gözlenirken dondurma sonrası 38°C’de yapılan inkübasyonlarda spermanın yaşam ömrünü kısalttığı saptanmıştır (43). Köpeklerde de Tris solüsyonuna katılan %1’lik EP’nin sperm aktivitesi başlatarak + 5 °C’de yaşam ömrünü kısalttığı bildirilmiştir (44). Assaf koyunlarında ise dondurma sonrası 37°C’de 6 saatlik inkübasyonda spermanın yaşam ömrünü önemli derecede artırdığı saptanmıştır (1). Genel olarak Equex Past’ın dondurma işleminde önemli derecede katkısının olduğu, ancak bazı

türlerde +5 ve 38°C’lerde olumsuz etkisinin olduğu gözlenmektedir. Koyunlarda ise hem dondurma sırasında hem de dondurma işlemi sonrası spermanın yaşam ömrünü uzatarak, dondurma işlemine katkı sağlayacak bir kimyasal olarak görülmektedir. Equex Past’ın değişik oranlarda ve kimyasallarla birlikte kullanılarak koruyucu etkisi sayesinde koç spermasının + 4 °C’de daha uzun süre saklanması katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Koç seminal sıvısı içerisinde sadece fruktoz bulursa da spermatozoa, sulandırıcı içerisine katılan glukoz ve mannozu enerji kaynağı olarak kullanabilir (14). Yapılan çalışmalarda enerji kaynağı olarak 0-62.4 mM glukoz veya fruktozun yeterli olduğu yönündedir. Sulandırıcıya eklenen yüksek oranda glikoz, hücre içi pH’yı 6.0 düşürebilir. Ayrıca her iki şekerde düşük moleküler ağırlığa sahip olup, hücre membranını geçebilirler ve sulandırıcının osmotik basıncını çok etkilemezler (12). Ethylenediamine-tetra-acetic acid (EDTA), metal iyonları ile şelat oluşturarak onların spermatozoa üzerine zararlı etkisi azaltacak kapasitasyon ve akrozom reaksiyonun indüklenmesini geciktirdiği için yaygın olarak ticari sulandırıcılarda 1.25-3.7 g/L miktarında kullanılmaktadır (12). BSA ise zamana bağlı sperm yaşlanmasını geciktirdiği (26) ve bu yüzden kısa süreli saklamalarda rolü önemlidir. Özellikle in vitro çalışmalarda sperm işleme amaçlı kullanılan TL-HEPES çalışma solüsyonuna 3 mg/ml miktarında eklenmektedir (45).

### **2. 6. 3. Koç Spermasının Biyo-fiziksel Özellikleri**

Koç spermasının dondurulması amacıyla yapılan çalışmalar daha çok boğa spermasında kullanılan yöntemlerin koyunlara aktarılması şeklinde olmuştur (14, 26). Koyun yetiştiriciliği ve sun’i tohumlama uygulamalarının yaygın olduğu Avusturalya’da yapılan çalışmalarda, dondurulmuş sperma ile intrauterin olarak tohumlanan koyunlarda %48, transservikal tohumlamada %32, servikal tohumlamada ise %9’luk gebelik oranı elde edilmiştir (14, 13).

Koyunlardaki dondurulmuş sperma ile tohumlama sonrası fertilité oranlarının sığırlardakine kıyasla oldukça düşük olması, erkeğe ve dişiye ait çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır. Erkeğe ait faktörlerin başında spermanın donma hasarına karşı direnci gelir. Spermatozoa membranının fosfolipid kompozisyonu, sıvı geçirgenliği, lipit faz transisyon ısısı, Na-K-ATPaz aktivitesi, su ve iyon kanallarının özellikleri türlere göre

farklılık gösterdiğinden spermatozoa'ların donmaya karşı dirençleri'de türlere göre farklılık gösterir (33). Türler e ait spermatojok farklılıklar, spermanın osmotok stres ve kryopreservasyona karşı verdiği cevabı da etkilediğinden sperma dondurma işlemleri, tür ve ırklara göre farklılık gösterebilmektedir. Ancak bu farklılıklara rağmen dondurma esnasında spermaların benzer fiziksel ve kimyasal streslere maruz kalması, kryopreservasyon işleminin tür bazında başarısını etkilemektedir (46, 47). Sulandırıcı ile temasa geçen spermatozoa başlangıçta büzüşür, sonra permeable kryoprotektanların hücre içerisine girmesi ile eski haline döner. Dondurma işlemi sırasında ise suyun hücre dışına çıkması sonucu yeniden büzüşür (48). Tüm bu değışimler hücre üzerinde farklı derecelerde stres oluşturur. Spermatozoanın dondurma-çözdürme sonrasında hayatta kalabilmesi, söz konusu değışimlere karşı göstereceğı dirence bağılıdır (49). Dondurma işlemi esnasında meydana gelen osmotok değışimler spermatozoalarda ölümcül hasarlara yol açabilir (50, 51). Boğa, koç, köpek, maymun, insan ve ratlarda yapılan çalışmalarda, sulandırıcı ve kryoprotektanların spermatozoa üzerinde oluşturduğu osmotok stres ve buna bağılı olarak osmotok güven aralıklarının farklılık gösterdiği görülmüştür (51-56).

### **3. MATERİYAL VE METOD**

Çalışmada, Harran Üniversitesi Döner Sermaye İşletme Müdürlüğü Ziraat-Veteriner Şubesi Araştırma Uygulama Çiftliğinde bulunan 2 adet ivesi koç kullanıldı. Sperma çiftleşme döneminde, koçlardan sun'i vajen yöntemi ile alınıp bir saat içerisinde kullanıldı. Alınan sperma pooling yapılarak ve nativ motilitesi-membran bütünlüğü %70'in üzerinde bulunanlar çalışmada kullanıldı. Nativ spermada başlıca spermatolojik özelliklerden miktar, motilite, yoğunluk, membran ve akrozom bütünlüğü ile pH değerlendirildi.

#### **3.1. Anisoosmatik Stresin Etkisi**

1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 10 µl nativ sperma konup üzerine, 150 µl değişik osmotik basınçtaki (75, 150, 225, 325, 425, 600, 900± 5 mOsm/kg olan sükröz) solüsyon eklendi, 5 dk bekletildikten sonra ortam izo-osmotik ortama gelmesi için, önceden tespit edilen miktarda The Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) ilave edildi. İşlem sonrası sperma motilite, membran ve akrozom bütünlüğü yönünden değerlendirildi. Çalışma altı kez tekrarlandı.

#### **3.2. 0.5, 1.0 ve 1.5 M Kryoprotektanların Etkisi**

0.5, 1.0 ve 1.5 M kryoprotektanlar izo-osmotik DPBS içerisinde hazırlandı. 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 10 µl sperma konup üzerine 250 µl 0.5, 1 ve 1,5 M olarak hazırlanan gliserol, DMSO, EG, PG içeren solüsyonlar eklendi. 5 dk bekletildikten sonra ortam izo-osmotik ortama gelmesi için, önceden tespit edilen miktarda DPBS ilave edildi. İşlem sonrası sperma motilite, membran ve akrozom bütünlüğü yönünden kontrol edildi. Çalışma altı kez tekrarlandı.

#### **3. 3. Spermanın Değerlendirilmesi**



**3. 3. 1. Motilite Muayenesi:** Motilite muayenesi, ısıtma tablalı faz-kontras mikroskopta yapıldı.

**3. 3. 2. Akrozom Muayenesi:** Boyamada, Alexa Fluor-488-PNA (peanut agglutinin) conjugate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) boyası ve OLYMPUS BX51 mikroskopu kullanıldı. 3 µl sperma lam üzerine smear edilip kurutulduktan sonra 100 µl absolute metanol ile yıkanıp, kullanılmaya kadar -20°C’de karanlık yerde saklandı. Lamelin boyanacak kısmının (küçük madeni para büyüklüğünde) altını cam kalemi ile işaretlenip, işaretli kısma 200 µl (10 µg Alexa Fluor-488-PNA içeriyor) boya eklenip ışık almayan bir kutuya yerleştirildi. Kutu ısıtma tablosunun üzerine konup ve 30 dk inkübe edildi. 30 dk sonunda boyanın üst kısmı PBS solüsyonunu ile nazıkçe yıkanarak fazla boyanın akmasını sağlandı. Yeniden 30 dk ısıtma tablası üzerinde yeniden inkübe edildi. Daha sonra sayım yapıldı. Spermatozoanın akrozom kısmı homojen yeşil renk verenler sağlam, vermeyen veya defektli verenler ise hasarlı olarak kabul edildi. Her bir örnek için 100 adet spermatozoon sayıldı.

**3. 3. 3. Membran Bütünlüğü Muayenesi:** Boyama işlemi için OLYMPUS BX51 floresan mikroskopu ve Propidium iodide (PI)/SYBR-14 viability kit (İnvitrogen) kullanıldı.  $1-5 \times 10^6$ /ml sperma içerecek şekilde 0,5 ml sperma ependorf tüplerine kondu ve üzerine önce toplam 1nM içeren 5 µl SYBR-14 eklenip 10 dk beklendi daha sonra, 5 µM içeren 5 µl PI eklenip 10 dk beklendikten sonra, lam üzerine 3 µl örnek konup üzeri lamel kapatılıp 100 spermatozoa sayıldı. PI ile boyanıp ve kırmızı flourasan yayanlar ölü. SYBR-14 ile boyanıp ve yeşil flourasan yayanlar canlı olarak kabul edildi.

### **3. 4. İstatistik Analiz**

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 13.5 istatistik programı kullanıldı. Değişik ozmotik ortam ve kryoprotektanların sperma üzerine etkisi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanarak yapılmıştır. Farklılığın hangi gruplar arasında olduğu ise Tukey testi ile belirlenmiştir. Spermatozoa testleri arası korelasyonun tespiti amacı ile Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart sapmaları tespit edilmiştir.  $p < 0.05$  istatistiksel anlamlı fark kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Çalışma iki ana bölümden oluşmuştur. Birinci kısım osmotik stresin sperm parametrelerine etkisi iken, ikinci kısımda kryoprotektanların sperm parametrelerine etkisi değerlendirilmiştir. Osmotik stresin 325-225 mOsm arasında, kontrol grubuna göre bir etkisi olmazken ( $p>0.05$ ), bu değerlerin altında ve üstünde olmasına bağlı olarak osmotik basıncın önemli oranda motilite ve membran bütünlüğüne zarar verdiği saptanmıştır ( $p<0.05$ ). En düşük motilite ve membran bütünlüğü 75 ve 900 mOsm'larda tespit edilmiştir. Ancak akrozom bütünlüğüne osmotik basıncın kontrol grubuna göre istatistiki önemde bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Motilite ve membran bütünlüğü testlerinin pozitif yönde bir korelasyon oluşturduğu saptanmıştır.

**Tablo 9.** Osmotik stresin sperm motilite, membran bütünlüğü ve akrozom üzerine etkisi

Guruplar	Motilite (%)	Membran bütünlüğü (%)	Akrozom Hasarı (%)
Kontrol	79.0±3.2 <sup>d</sup>	82.3±1.9 <sup>e</sup>	12.7±1.1 <sup>ab</sup>
75 mOsm	3.7±0.6 <sup>a</sup>	10.1±1.7 <sup>a</sup>	11.2±1.3 <sup>a</sup>
150 mOsm	21.7±3.1 <sup>b</sup>	23.7±3.2 <sup>b</sup>	14.0±1.5 <sup>ab</sup>
225 mOsm	71.7±3.1 <sup>d</sup>	66.5±3.8 <sup>d</sup>	14.0±1.2 <sup>ab</sup>
325 mOsm	75.0±2.2 <sup>d</sup>	71.3±2.2 <sup>de</sup>	17.0±1.6 <sup>ab</sup>
425 mOsm	56.7±3.3 <sup>c</sup>	52.5±2.3 <sup>c</sup>	16.5±1.9 <sup>ab</sup>
600 mOsm	24.2±2.7 <sup>b</sup>	23.3±3.6 <sup>b</sup>	18.3±2.1 <sup>b</sup>
900 mOsm	4.1±0.5 <sup>a</sup>	9.7±0.8 <sup>a</sup>	19.2±1.1 <sup>b</sup>
İstatistiki önem	*	*	*

Veriler, ortalama değer ±SEM dir.

<sup>a-d</sup>Aynı sütündeki farklı harfler, istatistiki farklılık göstermektedir ( $P<0.05$ )

\*  $P<0.05$  Grup ortalamaları arasındaki fark önemlidir.

Kryoprotektanların kimyasal yapısının ve dozlarının sperm üzerine değişik oranda etkisi olduğu saptanmıştır. 0.5 M'lük oranlarda kullanılan kryoprotektanların spermaya istatistiki önemde bir zarar vermediği saptanmıştır. 1.0 M oranda kryoprotektan

kullanıldığında ise, sadece gliserol önemli oranda motiliteyi etkilemiştir. Spermaya 1.5 M kryoprotektan eklendiğinde ise Gliserol ve DMSO motiliteyi düşürmüştür. EG ve PG'nin 0.5-1.5 M arasında bir olumsuz etkisi tespit edilememiştir. Ancak özellikle EG ve PG spermaya katılınca spermanın hızının önemli derecede arttırdığı da tespit edilmiştir. Membran bütünlüğü motilite ile pozitif korelasyon göstererek benzer biçimde etkilendiği saptanmıştır. Akrozom bütünlüğünün motilite ve membran bütünlüğünden farklı olarak kryoprotektanların oranı bağlı olmadan önemli derecede hasar gördüğü tespit edilmiştir. Veriler, motilite ve membran bütünlüğünün kryoprotektan dozu ve türüne bağlı olarak etkilenirken, akrozom bütünlüğünün 0.5 M gliserol hariç, tüm kryoprotektanlardan etkilendiği tespit edilmiştir.

**Tablo 10.** Değişik kryoprotektan ve oranlarının sperm motilite, membran bütünlüğü ve akrozom üzerine etkisi.

Gruplar	Motilite (%)	Membran bütünlüğü (%)	Akrozom Hasarı (%)
Kontrol	79.0±3.2 <sup>d</sup>	79.3±3.0 <sup>c</sup>	12.7±1.1 <sup>a</sup>
0.5 GLY	78.3±3.1 <sup>d</sup>	72.0±2.9 <sup>c</sup>	13.0±1.7 <sup>a</sup>
1.0 GLY	60.8±4.2 <sup>bc</sup>	61.2±4.8 <sup>bc</sup>	14.2±1.3 <sup>bc</sup>
1.5 GLY	19.1±3.7 <sup>a</sup>	23.3±4.4 <sup>a</sup>	18.2±0.9 <sup>bc</sup>
0.5 DMSO	71.7±1.7 <sup>bcd</sup>	68.8±3.4 <sup>bc</sup>	14.3±1.2 <sup>bc</sup>
1.0 DMSO	67.5±3.6 <sup>bcd</sup>	69.8±4.7 <sup>c</sup>	16.8±0.9 <sup>bc</sup>
1.5 DMSO	56.7±3.6 <sup>b</sup>	50.8±3.7 <sup>b</sup>	20.3±0.9 <sup>b</sup>
0.5 EG	78.3±3.1 <sup>d</sup>	70.3±2.5 <sup>c</sup>	14.7±1.2 <sup>bc</sup>
1.0 EG	75.0±2.2 <sup>cd</sup>	76.5±3.2 <sup>c</sup>	16.5±1.4 <sup>bc</sup>
1.5 EG	71.7±3.1 <sup>bcd</sup>	73.0±3.0 <sup>c</sup>	20.5±1.6 <sup>b</sup>
0.5 PG	71.7±4.0 <sup>bcd</sup>	65.0±4.2 <sup>bc</sup>	17.0±1.4 <sup>bc</sup>
1.0 PG	75.8±2.7 <sup>cd</sup>	76.0±2.3 <sup>c</sup>	16.0±1.9 <sup>bc</sup>
1.5 PG	70.0±4.5 <sup>bcd</sup>	70.1±6.2 <sup>c</sup>	19.1±1.8 <sup>bc</sup>
İstatistiki Önem	*	*	*

Veriler, ortalama değer ±SEM dir.

<sup>a-d</sup> Aynı sütündeki farklı harfler, istatistiki farklılık göstermektedir (P<0.05)

\* P<0.05 Grup ortalamaları arasındaki fark önemlidir.

## 5. TARTIŞMA

Koyunlar ilk evcilleştirilen hayvanlardan olup, et ve yapağısından yararlanan en yaygın çiftlik hayvanıdır. Koç spermasının başarılı biçimde dondurulması sektörün gelişmesi bakımından önemli katkı sağlayacaktır. Ancak günümüzde sığırlarda olduğu gibi başarılı sperm dondurma ve dondurulmuş sperma ile sun'i tohumlama konusunda ciddi sorunlar mevcuttur. Düşük sıcaklık, osmotik stres ve kryoprotektif kimyasalların dondurma sırasında spermatozoa üzerine etkisinin ortaya konması ve kullanılması, dondurma protokollerinin geliştirilmesi bakımından temel bir prensiptir (14, 26, 57).

Sunulan araştırmada, osmotik güven aralığının 325-225 mOsm arasında olduğu tespit edilmiştir. Solüsyonların bu değerlerin altında ve üstünde olmasına bağlı olarak osmotik basıncın önemli oranda motilite ve membran bütünlüğüne zarar verdiği saptanmıştır ( $p<0.05$ ). En düşük motilite ve membrane bütünlüğü 75 ve 900 mOsm'larda tespit edilmiştir. Ancak akrozom bütünlüğüne osmotik basıncın kontrol grubuna göre istatistiki önemde bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Farklı bir koyun ırkı kullanılarak yapılan çalışmada 225 mOsm'lük hipotonik solüsyonlarda motilite kaybı gözlenmeye başladığı bildirilmiştir (53). Sığırlarda da bu kayıpların 270 mOsm'den aşağıda gerçekleştiği saptanmıştır (58).

Sunulan araştırmada hipertonic ortamın motilite üzerindeki olumsuz etkisi 425 mOsm'de başlarken, sığırlarda 360 mOsm'de (58) köpeklerde ise 500 mOsm'da başladığı bildirilmiştir. Varisli (53) koç epididimal ve ejakulat sperması kullanarak yaptığı çalışmada; ozmotik stresin ejakulat ve epididimal sperma üzerine benzer etkisinin olduğu, 900 ve/veya 1200 mOsm sonrası motilitenin tamamen bittiği, 600 mOsm'da ise motilitenin önemli oranda azaldığını bildirmiştir.

Bu çalışmada ozmotik stresin spermatozoa akrozom bütünlüğü üzerine, kontrol grubuna göre, istatistiki önemde bir etkisi tespit edilememiştir. Sadece 75 mOsm'lük ozmotik ortam ile 600 ve 900 mOsm arasında bir fark gözlemlenmiştir ( $p<0.05$ ). Varisli (53) ise benzer biçimde ejakulat spermada değişik ozmotik ortamların akzorom membranı üzerine etkisini tespit edemezken, epididimal spermada 75 mOsm'lük ozmotik ortamın istatistiki

önemde bir etkisinin olduğunu bildirmiştir. Ayrıca bu farklılığın membran fosfo-lipid yapısındaki değişikliklerden kaynaklanabileceğini belirtmiştir.

Kryoprotektanların sperma üzerine değişik oranda etkisinin olduğu sunulan araştırmada saptanmıştır. Genel olarak kryoprotektanların motilite üzerine istatistiki önemde bir etkisi saptanmamıştır. Sadece Gliserol de 1 M ve üzeri, DMSO'da ise 1.5 M'lük oranlarda kullanıldığında motilite üzerine istatistiki önemde zararlı etkisi tespit edilmiştir. EG ve PG 0.5-1.5 M arasında bir olumsuz etkisi tespit edilememiştir. Ancak özellikle EG ve PG spermaya katılınca spermanın hızını arttırdığı da tespit edilmiştir. Spermatozoa hızının artması, enerji kaynaklarının hızla azalması ve atık ürünlerin ortaya çıkmasına bağlı olarak oksitatif stres faktörlerinin artmasını sağlayacağından istenmeyen bir durumdur. Sunulan araştırma ile benzer biçimde sonuç bildiren Varisli (53), çalışmasında koç sperması dondurulmasında kullanılan 1M Gliserol, DMSO ve Etilen Glikol (EG)'in hücre içine girip çıkarken verdiği hasar önemli bir motilite kaybı oluşmadığını bildirmiştir. Sığırlarda yapılan diğer bir çalışmada; 1M Gliserol, DMSO ve Etilen Glikol (EG)'in sırasıyla %31, %90 ve %6 oranında motilite kayıplarına yol açtığı belirtilmiştir (52). Kryoprotektanlardan EG, aygır sperması için en fazla toksik etkiye sahip iken (59), sığırlarda ve köpekte DMSO daha toksik etki göstermektedir (58, 49). Diğer taraftan kryoprotektanların oluşturduğu toksik etkinin derecesi de hayvan türlerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, kryoprotektanların köpek (49) ve maymun (55) spermalarında oluşturduğu toksik etki daha çok motilite kaybı şeklindeyken, rat spermalarında akrozom bütünlüğü kaybı şeklinde karşımıza çıkmaktadır (33). Yukarıdaki çalışmalar göz önünde tutulduğunda, dondurma işleminde kullanılacak sulandırıcı, katkı maddesi ve kryoprotektanların türe özgü olarak değerlendirilerek kombine edilmesi gerektiği görülmektedir.

Bu çalışmada, membran bütünlüğü motilite ile pozitif korelasyon göstererek benzer sonuçlar alınmıştır. Akrozom bütünlüğünün motilite ve membran bütünlüğünden farklı olarak kryoprotektanların oranı bağlı olmadan önemli derecede hasar gördüğü tespit edilmiştir. Veriler, motilite ve membran bütünlüğünün kryoprotektan dozu ve türüne bağlı olarak etkilenirken, akrozom bütünlüğünün 0.5 M gliserol hariç, tüm kryoprotektanlardan etkilendiği tespit edilmiştir. Varisli (53) koç sperması üzerine yaptığı benzer çalışmada, kryoprotektanların hem epididimal ve hem de ejakulat sperması akrozom bütünlüğü üzerine kryoprotektanların bir etkisinin olmadığını bildirmiştir. İki çalışma arasındaki farklılık

kullanılan koçların bireysel, ırksal farklılıklarından kaynaklanmış olabilir. Ancak her iki çalışmada da sağlam akrozom oranının %75-95 bandında olması, oluşan farklılığın kullanılan akrozom bütünlüğü tespit sınıflandırmasından değildi, diğer sebeplerden kaynaklanabileceğini göstermektedir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Elde edilen sonuçlar değişik ırka ait koçların fizyo-kimyasal ortamlara karşı benzer cevaplar versede önemli farklılıklarında olduğu tespit edilmiştir. İvesi koç sperması için 225-325 mOsm arası ozmotik ortamların güvenli olduğu daha yüksek ve düşük ozmotik ortamların, ozmotik ortamın derecesine bağlı olarak kademeli bir sperm hasarının olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak kryoprotektanların fizyo-kimyasal bir hasar oluşturmasında yüksek dozda Gliserol ve DMSO nun İvesi koç sperması için toksik olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada motilite ile membran bütünlüğü arasında pozitif korelasyon olduğu, ancak motilite ile akrozom bütünlüğünün değişik oranda fizyo-kimyasal ortamlardan hasar gördüğü gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, sperm dondurulması amacı ile hazırlanacak sulandırıcıların sunulan araştırmada tespit edilmiş fizyo-kimyasal sınırlar dikkate alınarak hazırlanırsa, dondurma işlemi olmadan oluşan hasarlar azaltılabilir. Böylece daha başarılı sperm dondurma protokolleri geliştirilebilir.

Ayrıca çalışma sonucu, elde edilen veriler bilimsel yayın ve kongre sunum gibi çıktılar sağlanması bakımından yarar sağlanacaktır. Kısaca bir erkek damızlıktan geniş ölçüde yararlanılması ancak spermanın uygun biyo teknik yöntemlerle kullanılması ile olasıdır.

## KAYNAKLAR

1. Yalçın BC. Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği. Tüm Vet Hayvancılık Hizmetleri Yayını No: 2, 1990; 390-391.
2. Panfi. Türkiye'de Koyun Yetiştiriciliği. 2013. Erişim: <http://www.panfi.com/sayfa/2094/turkiyede-koyun-yetistirciligi.html>. Erişim tarihi: 11/10/2013
3. Kaymakçı M, Sönmez R. İleri Koyun Yetiştiriciliği. Bornova-İzmir, 1996; 23-24, 37-43.
4. Tareks. 2013. Koyun Irklarımız. Erişim: [http://www.tareks.com.tr/\\_hayvancilik/index.php?ac=002\\_kucuk\\_bas](http://www.tareks.com.tr/_hayvancilik/index.php?ac=002_kucuk_bas). Erişim tarihi: 17/12/2013
5. Epstein H. The awassi sheep with special referances to the improved dairy type. FAO Animal Production Health Paper, 1985; 57: 141-158.
6. TÜİK. Türkiye İstatistik Kurumu. 2013. Erişim: <http://www.tuik.gov.tr/Start.do;jsessionid=RvfmP0mdKyJbJ1bhfy.6ILGmW8B956JGTC1sXQTzxp bhWhw1wNh2Q!-2142610850>. Erişim tarihi: 02/11/2013.
7. Pollott GE, Gootwine E. A Genetic analysis of complete lactation milk production in improved awassi sheep. Livestock Production Science, 2001; 71: 37-47.
8. Yurdaydın N. Şanlıurfa ve çevresinde hayvancılığın geliştirilmesi için öneriler. Şanlıurfa Ticaret ve Sanayi Odası Dergisi, 2002; 3 (7); 7-9.
9. Ekinci MS, Akyol İ, Karaman M, Özköse E. Hayvansal Biyoteknoloji Uygulamalarında Güncel Gelişmeler. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 2005; 8(2): 89-90.
10. Johnson, L.A. Sex Pre-selection in Rabbits Live Births from X and Y Sperm Separated by DNA and Cell Sorting. Biol. Reprod, 1989; 41: 199-203.
11. Kaymakçı M, Taşkın T. Türkiye Koyuncululuğunda Melezleme Çalışmaları Hayvansal Üretim, 2008; 49(2): 43-51.
12. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research, 1995; 63: 215-225.
13. Windsor DP, Szell AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC. Transcervical Artificial Insemination of Australian Merino Ewes With Frozen-Thawed Semen, Theriogenology, 1994; 42: 147-157.



14. Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 2000; 62: 77–111.
15. Paulenz H, Adnøy T, Fossen OH, Söderquist L. Effect on field fertility of addition of gelatine, different dilution rates and storage times of cooled ram semen after vaginal insemination. *Reprod Domest Anim*, 2010; 45(4): 706-10.
16. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen Storage of Ram Semen. II. Causes of Low Fertility After Cervical Insemination and Methods of Improvement. *Anim Reprod Sci*, 1995; 38: 1–36.
17. Pena A, Linde-Forsberg C. Effects of equex, one- or two- step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 2000; 54: 859–875.
18. World Health Organization, (1999): WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm Cervical Mucus Interaction. London: Cambridge University Press. Çeviri editor Günalp S.
19. Gökçen, H. Reprodüktif Fizyoloji. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Ed: E. Alaçam. 1. Baskı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi., Ankara, 1994; S:15-23.
20. Bruce. Florida Unv. Lab. Not. ANS 3319L Techniques in Domestic Animal Reproduction-Evaluation and Freezing of Semen, 2003; Erişim: <http://www.animal.ufl.edu/yelich/3319/Notes/ANS3319%20BSELab-04.pdf>. Erişim tarihi: 07/08/2013
21. Hafez B, Hafez E.S.E. (2000) Reproduction in farm animals 7 th edition.
22. Tekin N, Uysal O, Akçay E, Yavaş İ. Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 2006;53:179-184.
23. Uysal O, Kinet H, Çevik M, Çetinkaya S. Değişik antioksidanlar içeren farklı sulandırıcılarla dondurulmuş koç spermalarından elde edilen döl verimi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 2000; 47: 177-189.
24. Anel L, Paz P, Alvarez M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, Gonzalez M, Kaabi M, Anel E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*, 2003; 60: 1293-1308.
25. Byrne GP, Lonergan P, Wade MJ, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim Reprod Sci*, 2000; 62: 265-275.
26. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, 2000; 62: 143–172.

27. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, 2009; 10: 49–62.
28. Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci*, 2001; 68: 181–190.
29. Lopez-Saez A, Ortiz L, Gallego L, Garde JJ. Liquid storage (5 °C) of ram semen in different diluents. *Arch Androl*, 2000; 44: 155–164.
30. Aurich C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled–stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 2005; 89: 65–75.
31. Jones RC, Foote RH. Effect of osmolality and phosphate, TRIS, TES, MES, and HEPES hydrogen ion buffers on the motility of bull spermatozoa stored at 37 or 5 °C. *Aust J Biol Sci*, 1972; 25: 1047–1055.
32. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 2000; 53: 47–58.
33. Si W, Benson JD, Men H, Critser JK. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity, and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*, 2006; 53: 336–348.
34. Varisli O, Uguz C, Agca C, Agca Y (2009a). Effect of Chilling on The Motility and Acrosomal Integrity of Rat Sperm in The Presence of Various Extenders. *J Am Assoc Lab Anim*, 48(5), 1-7.
35. Varisli O, Agca C, Agca Y. Short-Term Storage of Rat Sperm in the Presence of Various Extenders. *J Am Assoc Lab Anim*, 2013; 52(6): 1-6.
36. Salamon S, Ritar AJ. Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust J Biol Sci*, 1982; 35: 295–303.
37. Varisli O, Scott H , Agca C, Agca Y. The effects of cooling rates and type of freezing extenders on cryosurvival of rat sperm. *Cryobiology*. 2013; 67(2): 109-116.
38. Kampschmidt R, Mayer DT, Herman HA. Lipids and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci*, 1953; 36: 733.
39. Farstad W. Cryopreservation of canine semen–new challenges. *Reprod Domest Anim*, 2009; 44 Suppl 2: 336-341.
40. Pontbriand D, Howard JG, Schiewe MC, Stuart LD, Wildt DE. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze–thawing on survival and acrosomal integrity of ram sperm, *Cryobiology*, 1989; 26: 341–354.

41. Akourki A, Gil L, Echegaray A, Espinosa E, Josa A, Blas I, Gonzalez N, Gallegos de la Hoya M, Meque LC. Effect of the extender supplement equex-stm on cryopreserved semen in the assaf sheep. *Cryo Letters*, 2004; 25(2).
42. Arriola J, Foote RH. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J Dairy Sci*, 1987; 70: 1664–70.
43. Axner E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. The effect of equex stm paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 2004; 84: 179–191.
44. Nizanski W, Klimowicz M, Partka A, Savic M, Dubiel A. Effect of the inclusion of equex stm into tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5 degrees C. *Reprod Domest Anim*, 2009; 44(2): 363-65.
45. Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined medium. *Biol Reprod*, 1983; 28: 235–247.
46. Purdy PH, The Post-Thaw Quality of Ram Sperm Held for 0 to 48 h at 5 Degrees C Prior to Cryopreservation, *Anim Reprod Sci*, 2006; 3(1-2): 114-123.
47. Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A. and Miller RR, Within and Between Breed Differences in Freezing Tolerance and Plasma Membrane Fatty Acid Composition of Boar Sperm, *Reproduction*, 2006; 131: 887-894.
48. Wood EJ, Gilmore JA, Liu J. Cryoprotective Agent and Temperature Effects on Human Sperm Membrane Permeabilities: Convergence of Theoretical and Empirical Approaches For Optimal Cryopreservation Methods. *Human Reproduction*, 2000; 15: 335-343.
49. Songsasen N, Yu I, Murton S, Paccamonti DL, Eilts BE, Godke RA. and Leibo SP. Osmotic Sensitivity of Canine Spermatozoa *Cryobiology*, 2002; 44: 9-90.
50. Li P, Li ZH, Dzyuba B, Hulak M, Rodina M, Linhart O. Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. *Reprod Biol*, 2010; 83(5): 852-58.
51. Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Reprod Biol*, 1993; 49(1): 112-23.
52. Awad MM. Effect of some permeating cryoprotectants on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 2011; 123(3-4): 157-62.
53. Varisli O, Uguz C, Agca C, Agca Y (2009). Motility and Acrosomal Integrity Comparisons Between Electro-Ejaculated and Epididymal Ram Sperm After Exposure to Range of Anisotonic Solutions, Cryoprotective Agents and Low Temperatures. *Anim Reprod Sci*, 110(3-4), 256-68.

54. Strzezek R, Fraser L. Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality. *Reprod Biol*, 2009; 9(2): 113-26.
55. Rutllant J, Pommer AC, Meyers SA. Osmotic tolerance limits and properties of rhesus monkey (*macaca mulatta*) spermatozoa. *J Androl*, 2003; 24(4): 534-41.
56. Chen Q, Peng H, Lei L, Zhang Y, Kuang H, Cao Y, Shi QX, Ma T, Duan E. Aquaporin 3 is a sperm water channel essential for post copulatory sperm osmoadaptation and migration. *Cell Res*, 2011; 21(6): 922-33.
57. Duncan AE, Watson PF. Predictive water loss curves for ram spermatozoa during cryopreservation: comparison with experimental observations. *Cryobiology*, 1992; 29: 95-105.
58. Guthrie HD, Liu J, Critser JK. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Reprod Biol*, 2002; 67(6): 467-78.
59. Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl*, 2011; 22(6): 284-95.