

Araştırma Makalesi

ERİTİLMİŞ KOÇ SPERMASINDA FARKLI GLİSEROL KATMA TEKNİKLERİNİN VE SOĞUTMA HIZININ SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERE ETKİSİ

Suleyman BACİNOĞLU^{*1}, Ümit CİRİT*, Zakeriya NUR**, Kemal AK*

Geliş Tarihi : 07.11.2006
Kabul Tarihi : 15.01.2007

Effect of Different Glycerol Addition Techniques and Cooling Rates on Spermatological Characteristics in Thawed Ram Semen

Summary: In the present study, effects of glycerol addition to semen at various temperatures and cooling rates of semen on the post-thaw semen characteristics on ram semen was investigated. Semen of 10 Kivircik rams of 3-5 years old were collected, pooled and frozen in straws. Six groups were established according to the extension of semen in a single step (30°C) or two steps (30°C and 5°C) and to the cooling technique to 5°C [slow (<0.2°C/min) or two (from 30°C to 16°C <2°C/min and then from 16°C to 5°C <0.2/min) stages]. Semen was extended with extender A without glycerol at 30°C and cooled to 5°C slowly (group 1) or in two-stages (group 2), at this temperature extender B was added. Again semen was extended with 2% glycerol bearing extender A at 30°C and cooled slowly (group 3) and in two-stages (group 4). The other groups were extended at 30°C with extender A and B (4% glycerol) and cooled slowly (group 5) or in two-stages (group 6). Samples were frozen in 0.25 ml straws after the equilibration. Spermatological examinations (motility, acrosomal and total morphological defect rates) were done after extension (level 1), after cooling to 5°C (level 2), after equilibration (level 3) and after thawing (level 4).

In the present study, it was concluded that (1) cooling from 30°C to 5°C in the presence of glycerol at 1:1/2 dilution rate, deteriorated the post-thaw motility, (2) this deterioration was compensated by two-staged cooling technique.

Key words: Ram Semen, Cooling Rate, Dilution Technique, Glycerol

* İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Abd İstanbul

** Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Abd Bursa

¹ Tel:+90 212 473 70 70 (17263), Fax:+90 212 473 72 41
e-mail: sbacin@istanbul.edu.tr and sbacin@ttnet.net.tr

Özet: Sunulan çalışmada spermaya gliserolün farklı ısılarda eklenmesi ve spermanın farklı hızlarda soğutulmasının, koçlarda donma sonrası spermatolojik özelliklere nasıl etkilediği araştırıldı. Üç-beş yaşlarında 10 baş Kivircik ırkı koçun spermaları alınarak pooling yapıldı ve sulandırılarak payetlerde donduruldu. Spermanın tek aşamada (30°C) veya iki aşamada (30°C'de ve 5°C'de) sulandırılması ve 5°C'ye yavaş (<0.2°C/dakika) ve iki-kademeli (30°C'den 16°C'ye <2°C/dakika ve 16°C'den 5°C'ye <0.2/dakika) soğutma tekniklerine göre 6 grup oluşturuldu: Sperma 30°C'de gliserol içermeyen sulandırıcı A ile sulandırıldı ve 5°C'ye yavaş (1. grup) ve iki-kademeli (2. grup) soğutuldu ve B sulandırıcısı ilave edildi. Yine sperma 30°C'de %2 gliserol içeren sulandırıcı A ile sulandırıldı ve 5°C'ye yavaş (3. grup) ve iki-kademeli (4. grup) soğutuldu. Diğer gruplarda, sulandırma işlemi sulandırıcı A ve B ile 30°C'de tamamlandı ve 5°C'ye yavaş (5. grup) ve iki-kademeli (6. grup) soğutuldu. Örnekler, ekilibasyon sonrası payetlerde donduruldu. Spermatolojik incelemeler (motilite, akrozomal ve toplam morfolojik bozukluklar), sulandırma sonrası (1. aşama), 5°C'ye soğutma sonrası (2. aşama), ekilibasyon sonrası (3. aşama) ve eritme sonrası (4. aşama) gerçekleştirildi.

Sunulan çalışmada (1) 1:1/2 sulandırma oranında 30°C'den 5°C'ye soğutma aşamasında ortamda gliserol varlığının, eritme sonrası motiliteye zarar verdiği, (2) bu zararın iki-kademeli soğutma tekniği ile azaldığı sonuçlarına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Koç Spermata, Soğutma Hızı, Sulandırma Tekniği, Gliserol

Giriş

Koç spermasının dondurulmasında karşılaşılan sorunların çözümüne ilişkin kısmi başarılar elde edilmiştir (11, 19, 20). Ancak, bu çalışmalarda kullanılan sulandırma oranları intraservikal tohumlama için oldukça yüksektir ve tohumlama dozunda sorunlar yaşanmaktadır (9, 10, 18). Eritme sonrası intraservikal suni tohumlamada başarıya ulaşmak için; yeterli sayıda ve özellikte spermatozoonun servikal bariyeri geçmesini sağlayacak sulandırıcılara ve sulandırma yöntemlerine ihtiyaç vardır (3, 8, 26). Düşük sulandırma oranlarında soğuk şoklarının olumsuz etkileri, sulandırıcıdaki kriyoprotektif maddelere, oranlarına, sulandırma ve soğutma tekniklerine göre değişmektedir. Gliserolün kriyoprotektif madde olarak etkili olmasının sebebi; spermatozoon plazma membranının sıvı özelliğine, soğutma sırasında geçirgenliğinin artmasına ve soğumaya bağlı bazı faz değişimlerini engellemesine bağlanmaktadır (25). Gliserol, donma anında geniş intraselüler kristal oluşumunu önleyerek ve hücrelerde dehidrasyonu gerçekleştirerek intraselüler yoğunluğu artırır ve spermatozoonu donmanın zararlı etkilerine karşı korur (31). Bununla birlikte, gliserolün 30°C ve 5°C'de motiliteyi düşürdüğü (22), intraservikal tohumlamalarda kuzulama oranını olumsuz yönde etkilediği (1), akrozom bozukluklarına neden olduğu (21), akrozom serbest yağ asitlerine bağlanarak kapasitesini ve akrozom reaksiyonunu hızlandırdığı bildirilmiştir (32). Watson (33) da, bazı gliserol moleküllerinin plazma membrandaki çift tabaka arasında kalarak membrandaki proteinler ve glikoproteinleri etkilediğini ve sonuçta membranın yapısını değiştirerek kapasitesini hızlandırdığını açıklamıştır.

Gliserolün toksik etkisi; soğutma ve donma hızına, sulandırıcının kompozisyonuna ve gliserolizasyon yöntemlerine bağlıdır (13, 29). Fiser ve Fairfull, (14), %4-6 gliserol konsantrasyonlarının optimal olduğunu, fakat ihtiyaç duyulan bu oranların sulandırıcının ozmolaritesini etkileyebileceğini vurgulamışlardır. Koç spermasına 30°C'de gliserollü sulandırıcının eklenmesi pratik ve yaygın bir yöntemdir (12, 30). Ancak Critser ve ark. (6), 30°C gibi yüksek ısıda gliserol ilavesinin zararlı olduğunu, çünkü gliserolün uzun süre sperma ile maruz kaldığını, üstelik bu ısıda gliserolün hücre membranına tamamen girdiğini, böylece gliserolün toksik etkisinin arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılara göre, gliserol 5°C'de eklendiğinde membranları geçme yeteneği ve toksik etkisi daha azdır. Benzer şekilde, Colas (4), koç spermasını 30°C'de ve 4°C'de %5 gliserol ve 1:4 sulandırma oranı kullanılmış ve 30°C'de gliserol ilavesinin spermatozoon motilitesini önemli derecede düşürdüğünü belirtmiştir.

Koç spermatozoonunun, membranlarında bulunan fosfolipidlerdeki farklı doymamış/doymuş yağ asidi oranları nedeniyle, diğer türlere göre ani ısı değişimlerine karşı daha hassas olduğu rapor edilmiştir (35). Bu nedenle koç spermasının dondurulmasında, optimal soğutma hızının sağlanması uygulamanın başarısı açısından önemlidir. Salomon ve Maxwell (29) koç spermasının 5°C'ye soğutulma süresinin genellikle 1-3 saat arasında değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Özellikle gliserolsüz sulandırıcılarda spermanın 2 saatten daha kısa sürede soğutulmasının zararlı olduğu ve ısının kademeli olarak düşürülmesi gerektiği belirtilmiştir (12, 29). Spermanın 18°C'den 5°C'ye soğutulmasında ise hızlı soğutmadan kaçınılması gerektiği, çünkü bu ısı aralığında spermatozoonların özellikle soğuk şokuna karşı hassas oldukları ifade edilmiştir (16, 24, 29).

Sunulan çalışmada spermaya gliserolün farklı ısılarda eklenmesi ve spermanın farklı hızlarda soğutulmasının, koçlarda donma sonrası spermatolojik özelliklere nasıl etki yaptığını belirlemek amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında aynı bakım ve beslenme koşullarında barındırılan 3-5 yaşlarında 10 baş Kıvrırcık ırkı koç kullanıldı. Koçlardan elektroejakulasyon yöntemiyle sperma alındı (2, 7). Alınan spermalar birleştirildikten (pooling) sonra sulandırıldı ve spermatolojik incelemeler gerçekleştirildi.

Spermanın Sulandırılması

Çalışmada Fiser ve arkadaşlarından modifiye edilen sulandırıcılar kullanıldı (5).

Sulandırıcı A'nın hazırlanması:

THAM (Tris (Hydroxymethyl) aminometane)	32.56 g.
B-fruktoz	9.35 g.
Sitrik asit	17.02 g.
Penicillin G	500.000 İ.Ü.
Dihidro streptomycine	625 mg.
Bidistile su	q.s.p. 1000 ml.

Sulandırıcı B'nin Hazırlanması:

Sodyum Sitrat (dihydrate)	6.88 g.
TES (N-Tris (hydroxymethyl-2-aminometane sulphonic acit)	58 g
Laktoz	101.88 g.
Fruktoz	5.06 g.
Dihidro streptomycine	625 mg.
Bidistile su	q.s.p. 1000 ml.

A ve B sulandırıcılarının ozmotik basınçları, gliserol ilavesi gerçekleştirilmeden önce ozmometre (Knauer, D-14163, Berlin) yardımıyla 375 mOsm'a ayarlandı.

Sulandırıcı A için sulandırma oranı 1:1/2 (Sperma:Sulandırıcı A), final sulandırma oranı ise 1:1 [Sperma (1):Sulandırıcı A (1/2):Sulandırıcı B(1/2)] olarak kullanıldı. Final gliserol oranı %4, final yumurta sarısı oranı ise %10 oldu. Sulandırıcı B, beşer dakika aralıklarla 10 eşit hacimde sulandırılmış spermaya ilave edildi.

Spermanın Soğutulması

5°C'ye soğutma işlemleri su banyosuna küçük buz parçaları atılarak gerçekleştirildi ve suyun ısısı dijital termometre ($\pm 200^\circ\text{C}$, Minitüb, Germany) ile ölçüldü. Yavaş soğutma tekniğinde sperma 30°C'den 5°C'ye $<0.2^\circ\text{C}/\text{dakika}$ soğutma hızında soğutuldu. İki-kademeli soğutma tekniğinde ise sulandırılmış sperma 30°C'den 16°C'ye $<2^\circ\text{C}/\text{dakika}$ ve 16°C'den 5°C'ye $<0.2/\text{dakika}$ soğutma hızında soğutuldu.

Spermanın Dondurulması

Donma öncesi örnekler 5°C'de iki saat ekilibrasyona bırakıldı. 0.25 ml payetlere doldurulan sulandırılmış spermalar (125×10^6 spermatozoon/payet), sıvı azot buharında (-110°C ile -130°C) 7 dakikada donduruldu ve sıvı azot içinde depolandı. İnceleme gününde payetler 37°C'de su banyosunda 30 saniye sürede eritildi.

Grupların Oluşturulması

Spermanın tek aşamada (30°C) veya iki aşamada (30°C'de ve 5°C'de) sulandırılması ve 5°C'ye soğutma tekniklerine (yavaş ve iki-kademeli) göre 6 grup oluşturuldu (Tablo 1).

1. Grup: Sperma 30°C'de gliserol içermeyen sulandırıcı A ile sulandırıldı ve 5°C'ye yavaş soğutuldu.

2. Grup: 30°C'de gliserol içermeyen sulandırıcı A ile sulandırıldı ve 5°C'ye iki-kademeli soğutuldu.

3. Grup: Sperma 30°C'de %2 gliserol içeren sulandırıcı A ile sulandırıldı ve 5°C'ye yavaş soğutuldu.

4. Grup: Sperma 30°C'de %2 gliserol içeren sulandırıcı A ile sulandırıldı ve 5°C'ye iki-kademeli soğutuldu.

5. Grup: Sperma Sulandırıcı A ve Sulandırıcı B ile 30°C'de sulandırıldı. 5°C'ye yavaş soğutuldu.

6. Grup: Sperma Sulandırıcı A ve Sulandırıcı B ile 30°C'de sulandırıldı. 5°C'ye iki-kademeli soğutuldu.

Tablo 1 : Farklı Sulandırma ve Soğutma Teknikleri
Table 1 : Different Dilution and Cooling Techniques

Özellikler	Gruplar					
	1	2	3	4	5	6
Sulandırma Tekniği	İki Aşamalı	İki Aşamalı	İki Aşamalı	İki Aşamalı	Tek Aşamalı	Tek Aşamalı
30°C'de Katılan Gliserol Oran (%)	0	0	2	2	4	4
Soğutma Hızı	Yavaş	İki kademeli	Yavaş	İki kademeli	Yavaş	İki kademeli

Spermatolojik İncelemeler

Motilite, akrozom ve toplam morfolojik bozukluklardan (TMB) oluşan spermatolojik incelemeler 30°C'de sulandırma sonrası (1.Aşama), 5°C'ye soğutma sonrası (2.Aşama), ekilibrasyon sonrası (3.Aşama) ve eritme sonrası (4.Aşama) gerçekleştirildi. Morfolojik incelemeler için her preparatta 200 hücre sayılarak yüzde değerleri alındı. Belirtilen işlemler 5 kez tekrarlandı (n=5). Sadece eritme sonrası

motilite için üç payet eritilerek % değerleri saptandı (n=15). Motilite incelemeleri ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta 400 büyütmede, morfolojik incelemeler Hancock solüsyonunda aynı mikroskopta 1000 büyütmede değerlendirildi.

İstatistiksel Analizler

Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalarda, the one-way analysis of variance (ANOVA) kullanıldı. Bulunan farklılıkların önem kontrolleri Duncan' s test ile yapıldı. Veriler arası korelasyonlar, the Pearson Correlation Test ile analiz edildi. Sonuçlar, ortalama ve standart hata olarak verildi (ortalama+standart hata). Tüm istatistiksel analizler SPSS programı (v. 10.0, MS Windows için) kullanılarak gerçekleştirildi.

Bulgular

Sulandırma, +5°C'ye soğutma, ekilibrasyon ve eritme sonrası saptanan spermatolojik özellikler Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2: Farklı Gliserol Katma Teknikleri ve Soğutma Hızlarının Spermatolojik Özelliklere Etkisi
Table 2: Effects of Different Glycerol Addition Techniques and Cooling Rates on Spermatological Characteristics

Özellik (%)	Aşama	Gruplar					
		1	2	3	4	5	6
Motilite	1*	78.6±5.56	78.6±5.56	79.3±4.45	79.3±4.45	75.7±6.07	75.7±6.07
	2*	80.0±4.08	79.3±5.35	75.0±4.08	76.4±5.56	75.0±4.08	75.7±6.07
	3*	73.6±6.90	74.3±5.35	74.3±6.07	75.0±6.46	73.6±4.76	73.6±8.02
	4**	31.0±9.83 ^a	31.7±10.17 ^a	16.2±7.23 ^c	24.1±8.46 ^b	31.0±8.31 ^a	35.5±6.87 ^a
Akrozom	1*	6.7±2.81	6.7±2.97	8.1±3.34	7.7±4.64	6.0±1.91	7.6±3.87
	2*	8.4±3.05 ^b	11.6±2.30 ^a	9.6±2.44 ^{ab}	9.7±1.25 ^{ab}	9.0±2.87 ^{ab}	8.7±1.80 ^b
	3*	9.1±2.04	11.4±6.85	9.3±2.29	9.7±2.81	8.6±3.15	11.0±3.11
	4*	36.7±6.04	40.4±7.02	40.6±5.1	38.0±5.13	35.6±8.38	35.3±8.06
Toplam	1*	38.0±7.07	38.3±6.92	36.4±5.47	37.0±6.38	39.9±5.81	41.4±5.00
	2*	36.7±3.77	40.7±3.20	36.4±4.47	37.4±6.21	35.7±4.53	35.7±3.73
	3*	36.4±8.68	43.6±9.42	37.7±4.53	37.3±4.23	36.7±6.96	40.2±7.71
	4*	54.7±7.54	54.7±11.27	58.0±7.53	56.6±6.24	48.1±7.38	56.4±10.64

^{ab}: Aynı satırda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

* n=5
** n=15

Aşama 1: 30°C'de sulandırma sonrası

Aşama 2: 5°C'ye soğutma sonrası

Aşama 3: Ekilibrasyon sonrası

Aşama 4: Eritme sonrası

30°C' deki sulandırma sonrası hiçbir özellik yönünden gruplar arasında bir farka rastlanmamıştır. Örnekler +5°C'ye soğutulduktan sonra 2. grupta (iki aşamalı, %0 gliserol, iki-kademeli soğutma) saptanan akrozom bozuklukları, 1. gruptakinden (iki aşamalı, %0 gliserol, yavaş soğutma) ve 6 gruptakinden (tek aşamalı, %4 gliserol, iki-kademeli soğutma) önemli derecede yüksek bulunmuştur (p<0.05). Ekilibrasyon sonrasında ise gruplar arasında hiçbir önemli fark saptanmıştır.

Eritme sonrasında tek fark motilite bulgularında elde edilmiştir. Motilitede diğer gruplar arasında farka rastlanmazken, 3. (iki aşamalı, %2 gliserol, yavaş soğutma) ve 4. (iki aşamalı, %2 gliserol, iki-kademeli soğutma) gruplardaki değerler diğer gruplardan düşük bulunmuştur (p<0.05). Aynı zamanda 3. gruptaki motilite, 4. gruptakinden de önemli oranda düşük bulunmuştur.

T a r t ı Ő m a

Gliserol günümüzde spermatozoanın dondurulmasında en yaygın olarak kullanılan kriyoprotektandır (30). Bununla birlikte gliserolün, 30°C ve 5°C'de motiliteyi düşürdüğü (22), intraservikal tohumlamalarda kuzulama oranını olumsuz yönde etkilediği (1), akrozom bozukluklarına neden olduğu (21), akrozom serbest yağ asitlerine bağlanarak kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunu hızlandırdığı bildirilmiştir (32). Mann ve White (23) ise, gliserolün protein ve enzim denaturasyonunu engelleyerek spermatozoonları donmanın zararlı etkilerinden koruduğunu, fakat koruyucu etkinin koç spermasında daha az olduğunu bildirmişlerdir.

Gliserolün soğutma prosedürünün hangi aşamasında ilave edileceği konusunda fikir birliği yoktur. Salomon ve Maxwell (28), gliserolün hem iki-aşamalı, hem de tek-aşamalı ilave edilebileceğini bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar, koç spermasına 30°C'de gliserollü sulandırıcının eklenmesinin pratik ve yaygın bir yöntem olduğunu rapor etmişlerdir (12, 30). Çalışmamızda 5. ve 6. gruplarda saptanan bulgular, bu bilgileri destekler niteliktedir. Ancak bu gruplarda soğutma aşamasındaki sulandırma oranı 1:1'dir. Daha düşük sulandırma oranı (1:1/2) kullanılan 3. ve 4. gruplarda ise en başarısız motilite bulguları saptanmıştır. Bu motilitedeki bu düşüklük, sulandırma oranının az olmasına ve ortamdaki gliserol varlığına bağlanabilir. Özetle, düşük sulandırma oranlarında soğutma aşamasındaki ortamda gliserol varlığı, eritme sonrası spermatozoon motilitesine zarar vermiştir. Bu bulgularımızın aksine Gil ve ark. (20), düşük oranlı sulandırmanın yarattığı zararlı etkilerin gliserol gibi kriyoprotektanların 5°C'ye soğutma öncesinde ilavesi ile önlenebileceğini vurgulamışlardır. Critser ve ark. (6) ise, 30°C gibi yüksek ısıda gliserol ilavesinin zararlı olduğunu, çünkü gliserolün uzun süre sperma ile maruz kaldığını, üstelik bu ısıda gliserolün hücre membranına

tamamen girdiğini, böylece gliserolün toksik etkisinin arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılara göre, gliserol 5°C'de eklendiğinde membranları geçme yeteneği ve toksik etkisi daha azdır. Görüldüğü gibi araştırmacılar arasında farklı görüşler mevcuttur. Elde edilen farklı sonuçlar, çalışmalarda uygulanan farklı soğutma ve donma hızlarına, sulandırıcılarının kompozisyonuna ve gliserolizasyon yöntemlerine bağlanabilir (13, 29). Çalışmamızda 30°C' de gliserol ilavesinin sperm motilitesi üzerindeki zararlı etkisi, sadece sulandırma oranı düşük olduğunda gözlenmiştir (3. ve 4. gruplar). Soğutma aşamasında gliserol varlığı ile ve sulandırma oranı arasındaki ilişki otaya koyan bir çalışmaya ulaşılamamıştır.

Koç spermatozoonunun, membranlarında bulunan fosfolipidlerdeki doymamış/doymuş yağ asidi oranındaki farklılıklar nedeniyle, diğer türlere göre ani ısı değişimlerine karşı daha hassas olduğu rapor edilmiştir (35). Salomon ve Maxwell (29) koç spermasının 5°C'ye soğutulma süresinin genellikle 1-3 saat arasında değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Spermanın 18°C'den 5°C'ye soğutulmasında ise hızlı soğutmadan kaçınılması gerektiği, çünkü bu ısı aralığında spermatozoonların özellikle soğuk şokuna karşı hassas oldukları ifade edilmiştir (16, 24, 29). Fiser ve Fairfull (15), 30°C'den 15°C'ye hızlı soğutulmasının spermatozoon canlılığı üzerinde olumsuz etki yapmaya bileceğini, fakat 15°C' den daha düşük ısılarla soğutulurken yavaş soğutulması gerektiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da yavaş soğutma tekniğinde sperma 30°C'den 5°C'ye <0.2°C/dakika hızında, iki-kademeli soğutma tekniğinde ise 30°C'den 16°C'ye <2°C/dakika ve 16°C'den 5°C'ye <0.2/dakika hızında soğutulmuştur. Soğutma hızları ele alındığında, en dikkati çeken bulgular 3. ve 4. gruplarda saptanmıştır. Bu gruplarda sperma, 30°C' de gliserol içeren sulandırıcı ile 1:1/2 oranında sulandırılmış, yavaş (3. grup) veya iki-kademeli (4. grup) soğutma hızında 5°C' ye soğutulmuştur. İki-kademeli soğutulan 4. gruptaki eritme sonrası motilite, 3. gruptakinden önemli oranda yüksek bulunmuştur (%24.1 ve 16.2, p<0.05). Düşük sulandırma oranlarında ortamda gliserol varsa iki-kademeli hızlı soğutma tekniği, motiliteyi korumuştur. Başka bir deyişle, gliserolün zararlı etkisi bu teknik ile azalmıştır. Soğutma aşamasında gliserol içermeyen 1. ve 2. gruplarda benzer bulguların elde edilmesi ve istatistiksel olarak önemsiz de olsa 5. gruba göre 6. grupta daha yüksek motilite saptanması (%31.0 ve %35.5, p>0.05), gliserol içeren medyumalarda sulandırma sonrası iki-kademeli tekniğin yararlı ve önerilebilir özellikte olduğunu göstermektedir. Bu teknikte spermanın gliserole maruz kalma süresi daha azdır. 30°C gibi yüksek ısılarda gliserol ilavesinin zararlı olduğu, gliserolün uzun süre sperma ile maruz kaldığı ve bu ısıda hücre membranına tamamen girdiği, böylece gliserolün toksik etkisinin arttığı bildirmiştir (6).

Sunulan çalışmada (1) 1:1/2 sulandırma oranında 30°C'den 5°C'ye soğutma aşamasında ortamda gliserol varlığının, eritme sonrası motiliteye zarar verdiği, (2) bu zararın iki-kademeli soğutma tekniği ile azaldığı sonuçlarına varılmıştır.

Kaynaklar

1. **Abdelhakeam, A.A., Graham, E.F and Vazquez, I.A.** Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen ram semen: Fertility trials and the effects of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*, 1991; 28: 36-42. 2
2. **Ak, K., Ak, S., Gürel, A., Hasöksüz, M ve Baran, A.** Koçlarda mycoplasma agalactiae'nin spermatolojik özelliklere etkisi üzerine deneysel araştırmalar. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 1995; 26 (2): 139-155. 6
3. **Anel, L., dePaz, P., Alvarez, M., Chomoro., C.A., Boixo, J.C., Manso, A et al.** Field and invitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*, 2003; 60: 1293-1308. 10
4. **Colas, G.** Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. *J Reprod Fertil*, 1975; 42: 277-285. 19
5. **Correa, J.R., Rodriquez, M.C., Patterson, D.J and Zavos, P.M.** Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*, 1996; 46 (3): 413-420. 20
6. **Critser, J.K., Huse-Benda, A.R., Aaker, D.V., Arneson, B.W and Ball, G.D.** Cryopreservation of human spermatozoon III: The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril*, 1988; 50 (2): 314-320. 21
7. **Curry, M.R., Millar, J.D and Watson, P.F.** Calculated optimal cooling Rates for Ram and Human Sperm Cryopreservation fail to conform with Empirical observations. *Biol Reprod*, 1994; 51: 1014-1021. 22
8. **Curry, M.R., Kleinhans, F.W and Watson, P.F.** Measurement of water permeability of the membrane of boar, ram and rabbit spermatozoon using concentration dependent self quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiology*, 2000; 41: 167-173. 24
9. **D'Alessandro, A.G.D., Martemucci, G., Collanna, M.A and Bellini, A.** Post thaw survival of ram spermatozoon and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, 2001; 55: 1159-1170. 25
10. **D'Alessandro, A.G and Martemucci, G.** Post-thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of Leccese rams frozen in different seasons with a milk-egg yolk extender. *Italian J Anim Sci*, 2005; 4: 139-148. 26
11. **El-Alamy, M.A and Foote, R.H.** Freezaability of spermatozoon from Finn and Dorset rams in multiple extenders. *Anim Reprod Sci*, 2001; 65: 245-254. 31
12. **Evans, G and Maxwell, W.M.C.** Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Sydney; Butterworths, 1987; 19: 91-141. 34

13. **Fahy, G.M.** The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology *Cryobiology*, 1986; 23: 1-13. 35
14. **Fiser, P.S and Fairfull, R.W.** The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoon frozen in straws. *Cryobiology*, 1984; 21: 542-551. 38
15. **Fiser, P.S and Fairfull, R.W.** Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoon. *Theriogenology*, 1986; 25 (3): 473-484. 39
16. **Fiser, P.S and Fairfull, R.W.** The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoon before and after freezing. *Cryobiology*, 1986; 23: 518-524. 40
17. **Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Söderquist, L and Rodriguez-Martinez, H.** Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*, 2002; 57: 1781-1792. 45
18. **Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L and Rodriguez-Martinez, H.** Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, 2003; 59: 1157-1170. 46
19. **Gil, J., Lundeheim, N., Söderquist, L and Rodriguez-Martinez, H.** Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 2003; 59: 1241-1255. 47
20. **Gökçen, H ve Aştı, R.N.** Sıvı azot buharında dondurma yönteminin çeşitli evrelerinde, koç spermatozoitlerindeki akrozom bozukluklarının saptanması. *A Ü Vet Fak Derg*, 1980; 27 (3-4): 501-514. 51
21. **Jones, R.C.** The use of dimethyl sulfoxide, glycerol and reconstituted skim milk for the preservation of ram spermatozoon. II.: The influence of diluent composition and processing time during freezing to -79°C with dimethyl sulfoxide or glycerol or both compounds. *Aust J Biol Sci*, 1965; 18: 887-899. 62
22. **Mann, T and White, L.G.** Glycerol metabolism by spermatozoon. *Biochem*, 1957; 65 (4): 634-639. 68
23. **Maxwell, W.M.C and Watson, P.F.** Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 1996; 42: 55-65. 73
24. **Noiles, E.E., Bailey, J and Storey, B.T.** Temperature dependence of the water permeability, LP of murine sperm shows a discontinuity between 4°C and 0°C. *Cryobiology*, 1995; 32: 220-238. 90
25. **Ollero, M., Perez-pe, R., Muino-Blanco, T and Cebrian-Perez, J.A.** Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, 1998; 37: 1-12. 95
26. **Salamon, S and Maxwell, W.M.C.** Frozen storage of ram semen. I: processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*, 1995; 37: 185-249. 113

27. **Salamon, S and Maxwell, W.M.C.** Frozen storage of ram semen. II: Causes of low fertility after cervical insemination and method of improvement. *Anim Reprod Sci*, 1995; 38: 1-36. 114
28. **Salamon, S and Maxwell, W.M.C.** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 2000; 62: 77-111. 115
29. **Sayre, B.L and Lewis, G.S.** Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin treated ewes. *Theriogenology*, 1997; 48: 267-275. 116
30. **Slavik, T.** Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoon with zona-free hamster eggs. *J Reprod Fertil*, 1987; 79: 99-103. 120
31. **Watson, P.F and Martin, I.C.** Artificial insemination of sheep : the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology*, 1976; 6: 559-564. 131
32. **White, I.G.** Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*, 1993; 5: 639-658. 134