

Değişik Ozmotik Basınç Düzeyleri ve Kryoprotektif Maddelerin İvesi Koç Spermaları Üzerine Etkisi

İbrahim Halil AGAS ¹, Ömer VARIŞLI ^{2*}, Nafiz YURDAYDIN ³

¹Türkiye Jokey Kulübü Şanlıurfa Aşım İstasyonu, Şanlıurfa, Türkiye.

²Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye.

³Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi:15.10.2014

Kabul Tarihi:18.12.2014

Özet: Günümüzde koyunlarda dondurulmuş sperma ile yapılan tohumlamalardan yeterli oranda fertilitate elde edilememektedir. Dondurma işlemi esnasında spermatozoa değişik oranlarda ozmotik basınç ve ısı stresine maruz kalır. Spermatozoa üzerinde oluşan bu olumsuz etkilerin azaltılması için dondurma metotları ve yeni sulandırıcılar denenmektedir. Bu çalışmanın amacı, anizo-ozmotik ortam ve kryoprotektanların ivesi spermatozoonları üzerine olan etkisini motilite, membran ve akrozom bütünlüğü yönünden değerlendirmektir. Sunulan çalışmada; çiftleşme sezonu içerisinde olan iki adet ivesi koçtan suni vajen yöntemiyle alınan ejakülatlar birleştirilip kullanıldı. Çalışma iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada; sperma 75, 150, 225, 325, 425, 600 ve 900±5 miliosmollük (mOsm)/kg sükröz solüsyonuna 5 dakika maruz bırakılıp yeniden izo-ozmotik duruma getirildi. İkinci aşamada, sperma 0.5, 1.0 ve 1.5 M gliserol (Gly), dimetilsülfoksit (DMSO), etilen glikol (EG) ve propilen glikol (PG) içeren solüsyonlara 5 dakika maruz bırakılıp yeniden izo-ozmotik duruma getirildi. Spermalar motilite, membran ve akrozom bütünlüğü yönünden değerlendirildi. Koç spermatozoonlarının motilitesi, izo-ozmotik olmayan stres faktörlerinden önemli derecede etkilendi (P<0.05). Genel olarak spermatozoa akrozom bütünlüğünü izo-ozmotik olmayan ortamdaki etkilenmezken, 75 mOsm'lük sükröz solüsyonu akrozom bütünlüğünü önemli oranda düşürdü. Kryoprotektanların spermaya eklenmesi ve uzaklaştırılması motilite ve akrozom bütünlüğünü (0.5 M Gly hariç) önemli derecede etkiledi (P<0.05). Sonuç olarak, ivesi koç spermalarının çeşitli stres faktörlerinden değişik ölçüde etkilendiği gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: İvesi, kryoprotektan, ozmotik tolerans, spermatozoon

Effects of various osmotic pressure levels and cryoprotective agents (CAPs) on Awassi Ram Spermatozoa

Abstract: Effective ram sperm cryopreservation protocols, which would yield acceptable fertility rates following artificial insemination (AI) 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 objectives of the current studies are to compare the effects of various anisoosmotic conditions, cryoprotective agents (CAPs) 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 (Gly), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and propylene glycol (PG) 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 anisoosmotic stress (P<0.05). While anisoosmotic 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 M Gly (P>0.05). In conclusion, the current data suggest that ram sperm was affected by cryobiologically stress conditions at different rates.

Keywords: Awassi, cryoprotectants, osmotic tolerance, sperm

Giriş

Koyun yetiştiriciliği ve suni tohumlama uygulamalarının yaygın olduğu Avusturalya'da yapılan çalışmalar, dondurulmuş sperma ile intrauterin olarak tohumlanan koyunlarda %48, trans-servikal tohumlamada %32, servikal tohumlamada ise %9'luk gebelik oranı elde

edilebildiğini bildirmişlerdir (Salamon ve Maxwell, 2000; Windsor ve ark., 1994). Koç spermalarının dondurulması için yapılan çalışmaların büyük kısmı boğa spermalarında kullanılan yöntemlerin koyunlara aktarılması şeklinde olmasına rağmen istenen başarı elde edilememiştir. Koyunda

dondurulmuş spermayla yapılan tohumlama sonrası fertilité oranlarının sığırdakine kıyasla oldukça düşük olması, erkeğe ve dişiye ait değişik faktörlerden kaynaklanmaktadır. Erkeğe ait faktörlerin başında spermanın donma hasarına karşı hassasiyeti gelir (Salamon ve Maxwell, 2000; Johnson ve ark., 2000).

Spermatozoa membranının fosfolipid kompozisyonu, sıvı geçirgenliği, lipit faz transisyon ısısı, Na-K-ATPaz aktivitesi, su ve iyon kanallarının özellikleri türlere göre farklılık gösterdiğinden spermatozoaların donmaya karşı dirençleri de türlere göre farklıdır (Si ve ark., 2006). Bu farklılıklar spermanın ozmotik stres ve donmaya karşı verdiği cevabı da etkilediğinden, sperma dondurma işlemleri tür ve ırklara göre değişkenlik gösterebilmektedir. Ancak bu farklılıklara rağmen dondurma esnasında spermatozoonların benzer fiziksel ve kimyasal streslere maruz kalması, dondurma işleminin tür bazında başarısını etkilemektedir (Purdy, 2006; Waterhouse ve ark., 2006). Sulandırıcıyla temasa geçen spermatozoa başlangıçta büzüşür, sonra geçirgen kryoprotektanların hücre içerisine girmesiyle eski haline döner. Dondurma işlemi sırasında ise hücre içi suyun, hücre dışına çıkması sonucu yeniden büzüşür (Wodd ve ark., 2000). Tüm bu değişimler hücre üzerinde farklı derecelerde stres oluşturur. Spermatozoanın dondurma-çözdürme sonrasında hayatta kalabilmesi, söz konusu değişimlere karşı göstereceği dirence bağlıdır (Songsasen ve ark., 2002). Dondurma işlemi esnasında meydana gelen ozmotik değişimler spermatozoalarda ölümcül hasarlara yol açabilir (Li ve ark., 2010; Gao ve ark., 1993). Boğa, koç, köpek, maymun, insan ve ratlarda yapılan çalışmalarda, sulandırıcı ve kryoprotektanların spermatozoa üzerinde oluşturduğu ozmotik stres ve buna bağlı olarak ozmotik güven aralıklarının farklılık gösterdiği görülmüştür (Awad, 2011; Varisli ve ark., 2009; Strzezek ve Fraser, 2009; Rutilant ve ark., 2003; Gao ve ark., 1993; Chen ve ark., 2011). Bu çalışmanın amacı, İvesi sperması için ozmotik ve kryoprotektan güven aralıklarının tespitidir.

Materyal ve Metot

Çalışmada, Harran Üniversitesi Döner Sermaye İşletme Müdürlüğü Ziraat-Veteriner Şubesi Araştırma Uygulama Çiftliğinde bulunan 2 adet ivesi koç kullanıldı. Sperma çiftleşme döneminde bulunan koçlardan sun'î vajen yöntemiyle alınıp bir saat içerisinde kullanıldı. Alınan spermalar birleştirildi ve nativ motilitesi, membran bütünlüğü %70'in üzerinde bulunanlar kullanıldı. Nativ spermada başlıca spermatolojik

özelliklerden; miktar, motilite, yoğunluk, membran ve akrozom bütünlüğü ile pH değerlendirildi.

Ozmotik Stresin Etkisi: 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 10 µl nativ sperma konup üzerine, 150 µl değişik ozmotik basınçtaki (75, 150, 225, 325, 425, 600, 900± 5 mOsm/kg olan sükröz) solüsyon eklendi, 5 dk bekletildikten sonra ortam izo-ozmotik 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. Yapılan bu çalışma altı tekrardan oluşmuştur.

Kryoprotektanların Etkisi: 0.5, 1.0 ve 1.5 M kryoprotektanlar 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 Gly, DMSO, EG, PG içeren solüsyonlar eklendi. 5 dk bekletildikten sonra ortam izo-ozmotik ortama gelmesi için, önceden tespit edilen miktarda DPBS ilave edildi. İşlem sonrası sperma motilite, membran ve akrozom bütünlüğü yönünden değerlendirildi.

Spermanın Deęerlendirilmesi:

Motilite Muayenesi: Motilite muayenesi ısıtma tablalı faz-kontras mikroskopta yapıldı.

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 yayıldıktan sonra kurutuldu ve 100 µl absolute metanol ile yıkanıp, kullanılıncaya kadar -20°C'de 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 tablasının üzerine konarak 30 dk inkübe edildi. 30 dk sonunda boyanın üst kısmı PBS solüsyonunu ile nazikce yıkanarak fazla boyanın akması sağlandı. Yeniden 30 dk ısıtma tablası üzerinde inkübe edildi. Daha sonra sayım yapıldı. Spermatozoanın akrozom kısmı homojen yeşil renk verenler sağlam, vermeyen veya hasarlı verenler ise hasarlı olarak kabul edildi. Her bir örnek için 100 adet spermatozoon sayıldı (Varisli ve ark., 2009).

Membran Bütünlüğü Muayenesi: Boyama işlemi için OLYMPUS BX51 floresan mikroskop ve Propidium iodide (PI)/SYBR-14 viability kit (İnvitrogen) kullanıldı. 1- 5x10⁶/ml sperma içerecek şekilde 0,5 ml sperma endorf tüplerine kondu ve

üzerine önce toplam 1µM içeren 5 µl SYBR-14 eklenip 10 dk beklendi daha sonra, 5 µM içeren 2 µl PI eklenip 5 dk daha 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 (Varisli ve ark., 2009).

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 yapıldı. Farklılığın hangi gruplar arasında olduğu ise Tukey testi ile belirlenmiştir. Spermatolojik testler arası korelasyonun tespiti amacı ile Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart sapmaları tespit edilmiş, $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edilmiştir.

Bulgular

Çalışma iki ana bölümden oluşmuştur. Birinci kısımda ozmotik stresin, ikinci kısımda ise kryoprotektanların sperm parametrelerine etkisi değerlendirilmiştir. Ozmotik güven aralığı 325-225 mOsm arasında tespit edilmiştir (Tablo 1). Bu değerlerin altında ve üstünde olmasına bağlı olarak ozmotik 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 ozmotik basıncın kontrol grubuna göre istatistiksel önemde bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Motilite ve membran bütünlüğü testlerinin pozitif yönde bir korelasyon oluşturduğu saptanmıştır.

Tablo 1. Ozmotik stresin sperm motilite, membran bütünlüğü ve akrozom üzerine etkisi.

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

Veriler, ortalama değer ±SEM dir.

^{a-d}Aynı sütundaki farklı harfler, istatistiksel farklılık göstermektedir ($P<0.05$).

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

Tablo 2. Değişik kryoprotektan ve oranlarının sperm motilite, membran bütünlüğü ve akrozom üzerine etkisi.

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

Veriler, ortalama değer ±SEM dir.

^{a-d}Aynı sütundaki farklı harfler, istatistiksel farklılık göstermektedir ($P<0.05$).

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

Kryoprotektanların kimyasal yapısı ve dozlarının sperm üzerine değişik oranda etkisi

olduğu saptanmıştır. 0.5 M oranında kullanılan kryoprotektanların spermaya istatistiksel önemde bir

zarar vermediği saptanmıştır. 1.0 M oranında kryoprotektan kullanıldığında ise, sadece gliserol önemli oranda motiliteyi etkilemiştir. Spermaya 1.5 M kryoprotektan olarak eklenen Gliserol ve DMSO motiliteyi düşürmüştür. EG ve PG 0.5-1.5 M arasında bir olumsuzluğa yol açmadığı tespit edilmiştir (Tablo 2). Membran bütünlüğü motilite ile benzer biçimde stres faktörlerinden etkilendiği saptanmıştır. Akrozom bütünlüğünün motilite ve membran bütünlüğünden farklı olarak kryoprotektanların oranına 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.

Tartışma ve Sonuç

Koç spermasının başarılı biçimde dondurulması küçük hayvan yetiştiriciliği sektörünün gelişmesi bakımından önemli katkı sağlayacaktır. Ancak günümüzde sığırlarda olduğu gibi koç spermasını dondurma ve dondurulmuş sperma ile suni tohumlama konusunda ciddi sorunlar mevcuttur. Bu nedenle koç sperması üzerine daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu bakımdan düşük sıcaklık, ozmotik stres ve kryoprotektif kimyasalların dondurma sırasında spermatozoa üzerine etkisinin ortaya konması ve kullanılması, dondurma protokollerinin geliştirilmesi bakımından önemlidir (Salamon ve Maxwell 2000; Johnson ve ark., 2000; Duncan ve Watson 1992).

Sunulan araştırmada, İvesi koç sperması için ozmotik güven aralığının 325-225 mOsm arasında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Solüsyonların bu değerlerin altında ve üstünde olması ozmotik basıncın önemli oranda motilite ve membran bütünlüğüne zarar verdiği saptanmıştır ($p < 0.05$). En düşük motilite ve membran bütünlüğü 75 ve 900 mOsm'larda olan solüsyonlarda tespit edilmiştir. Ancak akrozom bütünlüğüne ozmotik 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 başlandığı bildirilmiştir (Varisli ve ark., 2009). Sığırlarda da bu kayıpların 270 mOsm'den aşağıda gerçekleştiği saptanmıştır (Guthrie ve ark., 2002). Sunulan araştırmada hipertonic ortamın motilite üzerindeki olumsuz etkisi 425 mOsm'de başlarken, sığırlarda 360 mOsm'de (Guthrie ve ark., 2002) köpeklerde (Sangsasen ve ark.,) ise 500 mOsm'da başladığı bildirilmiştir. Varisli ve ark., (2009) koç epididimal ve ejakulat spermasının ozmotik strese karşı benzer tepki verdiği, 900 ve 1200 mOsm

sonrası spermada motilitenin tamamen bittiği, 600 mOsm'da ise motilitenin önemli oranda azaldığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada ozmotik stresin spermatozoa akrozom bütünlüğü üzerine, kontrol grubuna göre, istatistiki önemde bir etkisi tespit edilememiştir (Tablo 1). Sadece 75 mOsm'lük ozmotik ortam ile 600 ve 900 mOsm arasında bir fark gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Varisli ve ark., (2009) benzer biçimde ejakulat spermada değişik ozmotik ortamların akrozom membranı üzerine etkisini tespit edemezken, epididimal spermada 75 mOsm'lük ozmotik ortamın istatistiki önemde bir etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu farklılığın membran fosfo-lipid yapısındaki değişikliklerden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Sunulan araştırmada, genel olarak kryoprotektanların motilite üzerine istatistiki önemde bir etkisi saptanmamıştır. Sadece Gliserol 1 M ve üzeri, DMSO'da ise 1.5 M'lük oranlarda kullanıldığında motilite üzerine istatistiki önemde zararlı etkisi tespit edilmiştir. 0.5-1.5 M oranında kullanılan EG ve PG'nin bir olumsuz etkisi tespit edilememiştir (Tablo 2). Sunulan araştırma ile benzer biçimde bir sonuç bildiren Varisli ve ark., (2009); çalışmalarında koç sperması dondurulmasında kullanılan 1M Gliserol, DMSO ve Etilen Glikol (EG)'in hücre içine girip çıkarken verdiği hasar, önemli bir motilite kaybı oluşturmadığını belirtmişlerdir. Sığırlarda yapılan diğer bir çalışmada; 1M Gliserol, DMSO ve Etilen Glikol (EG)'in sırasıyla %31, %90 ve %6 oranında motilite kayıplarına yol açtığı belirtilmiştir (Awad, 2011). Kryoprotektanlardan EG, aygır sperması için en fazla toksik etkiye sahip iken (Ball ve ark., 2011), sığırlarda ve köpekte DMSO daha toksik etki göstermektedir (Guthrie ve ark., 2002; Songsasen ve ark., 2002). Diğer taraftan kryoprotektanların oluşturduğu toksik etkinin şekli de hayvan türlerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, kryoprotektanların köpek (Songsasen ve ark., 2002) ve maymun (Rutllant ve ark., 2003) spermalarında oluşturduğu toksik etki daha çok motilite kaybı şeklindeyken rat spermalarında akrozom bütünlüğü kaybı şeklinde karşımıza çıkmaktadır (Si ve ark., 2006). Yukardaki çalışmalar göz önünde tutulduğunda, dondurma işleminde kullanılacak sulandırıcı, katkı maddesi ve kryoprotektanların türe özgü olarak değerlendirilerek kombine edilmesi gerektiği görülmektedir.

Bu çalışmada; akrozom bütünlüğünün motilite ve membran bütünlüğünden farklı olarak kryoprotektanların oranına 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 ve ark., (2009) kryoprotektanların koç epididimal ve ejakulat spermanın akrozom bütünlüğü üzerine kryoprotektanların bir etkisinin olmadığını bildirmiştir. Bu iki çalışma arasındaki farklılık, kullanılan koçların bireysel, ırksal farklılıklarından ve akrozom bütünlüğü tespitinde kullanılan testin sınıflandırma farklılıklarından kaynaklanmış olabilir. Ancak, her iki çalışmada da sağlam akrozom oranının %75-95 bandında olması, oluşan farklılığın kullanılan akrozom bütünlüğü tespit sınıflandırmasından değil diğ er sebeplerden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar, değişik ırka ait koçların fizyo-kimyasal ortamlara karşı benzer cevaplar verse de önemli farklılıkların oluşabileceğini göstermiştir. 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 oluşturma da yüksek dozda Gliserol ve DMSO'nun İvesi koç sperması için toksik olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, sperm dondurulması amacı ile hazırlanacak sulandırıcılar, sunulan araştırmada tespit edilmiş fizyo-kimyasal sınırlar dikkate alınarak hazırlanırsa, dondurma işlemi olmadan oluşan hasarlar azaltılabilir. Böylece daha başarılı sperma dondurma protokolleri geliştirilebilir.

Kaynaklar

Awad MM, 2011: Effect of some permeating cryoprotectants on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *AnimReprod Sci*, 123(3-4), 157-162.

Ball BA, Vo A, 2011: Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl*, 22(6), 284-295.

Chen Q, Peng H, Lei L, Zhang Y, Kuang H, Cao Y, Shi QX, Ma T, Duan E, 2011: Aquaporin 3 is a sperm water channel essential for post copulatory sperm osmoadaptation and migration. *Cell Res*, 21(6), 922-933.

Duncan AE, Watson PF, 1992: Predictive water loss curves for ram spermatozoa during cryopreservation: comparison with experimental observations. *Cryobiology*, 29, 95-105.

Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhaus FW, Mazur P, Critser JK, 1993: Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod*, 49(1), 112-23.

Guthrie HD, Liu J, Critser JK, 2002: Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, 67(6), 467-478.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM, 2000: Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, 62, 143-172.

Li P, Li ZH, Dzyuba B, Hulak M, Rodina M, Linhart O, 2010: Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. *Biol Reprod*, 83(5), 852-858.

Purdy PH, 2006: The Post-Thaw Quality of Ram Sperm Held for 0 to 48 h at 5 Degrees C Prior to Cryopreservation, *Anim Reprod Sci*, 3(1-2), 114-123.

Rutlant J, Pommer AC, Meyers SA, 2003: Osmotic tolerance limits and properties of rhesus monkey (*macaca mulatta*) spermatozoa. *J Androl*, 24(4), 534-541.

Salamon S, Maxwell WM, 2000: Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 62, 77-111.

Si W, Benson JD, Men H, Critser JK, 2006: Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity, and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*, 53, 336-348.

Strzezek R, Fraser L, 2009: Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality. *Reprod Biol*, 9(2): 113-126.

Songasen N, Yu I, Murton S, Paccamonti DL, Eilts BE, Godke RA, 2002: and Leibo SP, 2002: Osmotic Sensitivity of Canine Spermatozoa. *Cryobiology*, 44, 9-90.

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), 256-268.

Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A. and Miller RR, 2006: Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, 131: 887-894.

Windsor DP, Szell AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC, 1994: Transcervical artificial insemination of australian merino ewes with frozen-thawed semen, *Theriogenology*, 42, 147-157.

Wood EJ, Gilmore JA, Liu J, 2000: Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction*, 15, 335-343.

*Yazışma Adresi: Ömer VARIŞLI

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kırıkkale,
Türkiye.

e-mail: omer.dvm@gmail.com