

Şubat / February 2019  
Cilt / Volume 2  
Sayı / Issue 1

# SABIAD

SAĞLIK BİLİMLERİNDE İLERİ ARAŞTIRMALAR DERGİSİ

JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH IN HEALTH SCIENCES

e-ISSN:2651-4060



Fotoğraf Prof. Dr. Alper Baran

## ORJİNAL MAKALE / ORIGINAL ARTICLE

**Koç Spermasının Dondurulmasında Seminal Plazma ve Soğutma Öncesi Gliserol İlavasının Spermatolojik Özelliklere Etkisi**

*Effect of Seminal Plasma and Pre-cooling Addition of Glycerol during Freezing of Ram Semen on Spermatological Characteristics*

**Piyasada Satışa Sunulan Soslerin Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi**

*Determination of Microbiological Quality of Sausages Sold in Markets*

## DERLEME / REVIEW

**Türkiye’de Yanık Tedavisinde Geleneksel Olarak Kullanılan Bitkiler**

*Plants Traditionally Used in the Treatment of Burns in Turkey*

**Adölesanlarda Sık Görülen Jinekolojik Sorunlar**

*Common Gynecological Problems of Adolescents*

**Hastalıklar ve Antik DNA: Dün ve Bugün**

*Diseases and Ancient DNA: Past and Today*



# SABIAD

SAĞLIK BİLİMLERİNDE İLERİ ARAŞTIRMALAR DERGİSİ

e-ISSN:2651-4060

JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH IN HEALTH SCIENCES

Şubat / February 2019  
Cilt / Volume 2  
Sayı / Issue 1





## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

---

### **Araştırma Yazıları**

- Koç Spermasının Dondurulmasında Seminal Plazma ve Soğutma  
Öncesi Gliserol İlavesinin Spermatolojik Özelliklere Etkisi ..... 01  
*Effect of Seminal Plasma and Pre-cooling Addition of Glycerol during  
Freezing of Ram Semen on Spermatological Characteristics*  
Ambrose Samuel Jubara Tombi, Kemal Ak, Alper Baran

- Piyasada Satışa Sunulan Sosislerin Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi..... 13  
*Determination of Microbiological Quality of Sausages Sold in Markets*  
İlkay Sinem Aras, Ömer Çetin

### **Derleme Makaleler**

- Türkiye’de Yanık Tedavisinde Geleneksel Olarak Kullanılan Bitkiler..... 18  
*Plants Traditionally Used in the Treatment of Burns in Turkey*  
Fatma Göç, Afife Mat

- Adölesanlarda Sık Görülen Jinekolojik Sorunlar ..... 36  
*Common Gynecological Problems of Adolescents*  
Özge Çetin, Ergül Aslan

- Hastalıklar ve Antik DNA: Dün ve Bugün ..... 44  
*Diseases and Ancient DNA: Past and Today*  
Ezgi Gizem Berkay, Can Veysel Şoroğlu, Burçak Vural

## Koç Spermasının Dondurulmasında Seminal Plazma ve Soğutma Öncesi Gliserol İlavesinin Spermatolojik Özelliklere Etkisi\*

### *Effect of Seminal Plasma and Pre-cooling Addition of Glycerol during Freezing of Ram Semen on Spermatological Characteristics*

Ambrose Samuel Jubara Tombi<sup>1</sup>, Kemal Ak<sup>2</sup>, Alper Baran<sup>2</sup>

#### ÖZET

Koç spermasının dondurulmasında düşük sulandırma oranları için katkı maddeleri ve santrifüj teknikleri üzerine yoğun olarak çalışılmaktadır. Pooling yapılmış sperma 4 eşit hacme ayrılarak 1:1 oranında sulandırıldı, kontrol grubu (A1), %20 seminal plazmalı (A2), %2 gliserol ilaveli (A3) ve %20 seminal plazma ile %2 gliserollü (A4) grupları oluşturuldu. Soğutma ve gliserolizasyon sonrası sperma payetlerde donduruldu. İkinci aşamada pooling yapılan sperma önce iki eşit hacme ayrılarak 26°C'de seminal plazmasız (B grupları) ve %20 seminal plazmalı (C grupları) süt tozu-yumurta sarısı sulandırıcıları ile 1:1 oranında sulandırıldı. Soğutma ve gliserolizasyon sonrası sekiz grup oluşturuldu. B1 ve C1 grupları seminal plazmalı veya seminal plazmasız sulandırıcıların kontrol gruplarını oluşturdu. B2 ve C2 gruplarına gliserolizasyon anında %10 seminal plazma ilave edildi. B3 ve C3 gruplarında gliserolizasyon sonrası santrifüj işlemi uygulandı ve sonrasında hacmin üstte kalan %50'si ortandan uzaklaştırıldı. B4 ve C4 gruplarında ise yine santrifüj işlemi uygulandı ancak süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra %10 seminal plazma ilave edildi. Soğutma öncesi ve/veya 5°C'de sulandırıcılara seminal plazma ilavesinin; sulandırma, soğutma ve dondurmanın zararlı etkilerine karşı spermatozoonları koruduğu, soğutma sırasında oluşan akrozomal bozuklukların, 5°C'de seminal plazma ilavesiyle azaldığı ve santrifüj işlemi sonrası %10 seminal plazma ilavesinin bu zararları önemli oranlarda azalttığı saptandı. Koç spermasının süt tozu-yumurta sarısı sulandırıcısında dondurulmasında soğutma öncesi %20 seminal plazma ilavesinin ve 5°C'de santrifüj sonrası %10 seminal plazma ilavesinin önerilebilir özellikte olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Koç, sperma dondurma, seminal plazma, gliserol, santrifüj

#### ABSTRACT

Effects of low dilution rate on cryopreservation of ram semen, intensive study on protective ingredients and centrifugation techniques is needed. Pooled semen splitted in to 4 equal volumes, extended to 1:1 ratio forming control group (A1), 20% seminal plasma (A2), 2% glycerol (A3), 20% seminal plasma, 2% glycerol (A4) groups. After cooling and glycerolization, semen were frozen in straws. In the second phase of this study, pooled semen first splitted in to two equal volumes, extended to 1:1 ratio at 26°C without seminal plasma (B group), and 20% seminal plasma (C group) extender. After cooling and glycerolization, eight groups were formed. B1, C1 control groups, B2, C2 groups supplemented with 10% seminal plasma immediately after glycerolization, B3, C3 groups were centrifuged and had 50% of their volume removed as supernatant, B4, C4 groups were supplemented with 10% seminal plasma after centrifugation and removal of supernatant. It was determined that addition of seminal plasma to extenders before cooling and/or at 5°C protected spermatozoa against the detrimental effects of dilution, cooling, freezing and that acrosomal damages, occurred during cooling, were reduced by seminal plasma addition at 5°C and acrosomal integrity and this detrimental effect was reduced to a significant proportion by addition of 10% seminal plasma. Pre-cooling addition of 20% seminal plasma to skim milk-egg yolk extender and 10% seminal plasma addition after centrifugation at 5°C can be suggested for freezing ram semen.

**Keywords:** Ram, semen freezing, seminal plasma, glycerol, centrifugation

\*İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006, Doktora Tezi

<sup>1</sup> Dr., Bahr El Ghazal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Sudan

<sup>2</sup> Prof. Dr., İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

#### Sorumlu yazar/Corresponding author:

Alper Baran,  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 34320, Avcılar-İstanbul, Türkiye  
Tel: +90 212 473 7070-17261  
E-mail: peralp@istanbul.edu.tr

Geliş tarihi / Date of receipt: 01.04.2018

Kabul tarihi/Date of acceptance: 05.02.2019

## GİRİŞ

Koç spermasının dondurulmasındaki zorluklar ve suni tohumlama sonrasındaki gebelik oranlarının düşük olması nedeniyle bu uygulamaların yaygınlaşması sınırlı seviyede olmuştur. Koç spermasının dondurulmasında karşılaşılan sorunların çözümüne ilişkin kısmi başarılar elde edilmiştir.<sup>14,22,23,35</sup> Ancak, bu çalışmalarda kullanılan sulandırma oranları intraservikal tohumlama için oldukça yüksektir ve tohumlama dozunda sorunlar yaşanmaktadır.<sup>12,13,21</sup> Eritme sonrası intraservikal suni tohumlamada başarıya ulaşmak için yeterli sayıda ve özellikte spermatozoonun servikal bariyeri geçmesini sağlayacak sulandırıcılara ve sulandırma yöntemlerine ihtiyaç vardır.<sup>11,41</sup> Koyunlarda intraservikal tohumlamada tohumlama dozu, ineklerdeki intraservikal tohumlama dozuna göre yaklaşık 10 kat ( $200 \times 10^6$  spermatozoon) fazladır.<sup>47</sup> Belirtilen sayıya ulaşmak için final sulandırma oranı yaklaşık 1:3'tür (sperma+sulandırıcı).<sup>23</sup> Bu düşük sulandırma oranı; spermatozoon motilitesi, membran bütünlüğü ve kapasitasyon oranları üzerine olumsuz etki yapmaktadır. Koç sperması düşük sulandırma oranlarında soğuk şoklarına karşı çok hassastır.<sup>19,29,35,47,53,58</sup> Optimal tohumlama dozuna ulaşmak için yüksek oranda sulandırma sonrası soğutma ve santrifüj yardımıyla spermatozoon yoğunluğunun artırılması işlemleri gerçekleştirilmektedir. Ancak santrifüj işleminin; akrozom ve DNA'larda bozukluklara ve ölümlere yol açtığı rapor edilmiştir.<sup>13,26</sup>

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 geçirgenliğine ve soğumaya bağlı bazı faz değişimlerini engellemesine bağlanmaktadır.<sup>38</sup> Kriyoprotektif madde olmasına rağmen gliserol spermatozoonlar için metabolik zehirdir ve kullanıldığı yoğunluk ve ısıya bağlı olarak membran bütünlüğüne zarar verebilir. Bu nedenle başarılı sonuçlar elde etmek için sulandırıcılarda optimal gliserol oranlarının belirlenmesi gerektiği araştı-

ricıların ortak görüşüdür.<sup>9,16,18,20</sup> Düşük sulandırma oranlarında soğutma öncesi sulandırıcılara %2 oranında gliserol ilavesinin eritme sonrası spermatojik özelliklere ve fertiliteye olumlu etki yaptığı bildirilmiştir.<sup>4</sup> Son yıllarda yapılan diğer çalışmalarda sulandırıcılara seminal plazma ilavesinin (%10, %20, %30) koç spermalarını soğutma ve donmanın zararlarına karşı koruduğu bildirilmiştir.<sup>32,33,36,41,42</sup>

Koç spermasının sulandırılması sonrası, seminal plazma protein yoğunluğunun yaklaşık %70-%80 oranında azaldığı ve bu azalmanın spermatozoon membranlarında değişikliklere ve erken kapasitasyona neden olduğu açıklanmıştır.<sup>37</sup> Bu nedenle donma öncesi santrifüj işlemi yardımıyla spermadan seminal plazma ayrılması spermatozoonlara zararlı etki göstermektedir.

Seminal plazma, rete testis, epididimis ve eklen-ti üreme bezlerinde üretilen sıvıyı içeren fizyolojik bir sekresyondur. Seminal plazma organik ve inorganik komponentlerin kompleks bir karışımıdır ve spermatozoonların fonksiyonlarını düzenlemek için spesifik çeşitli biyokimyasal bileşenler içerir. Yanagimachi<sup>60</sup>, ejakulasyonda sperma hücreleri ile seminal plazmanın temas ettiğini, seminal plazmadaki koruyucu faktörlerin spermatozoon yüzeyine bağlandığını ve bu faktörlerin hücreden uzaklaştırılmasına kadar erken kapasitasyon olaylarının önlediğini bildirmiştir.

Medeiros ve ark.<sup>34</sup>, spermanın sulandırılması veya donma işlemi sırasında hipertonic ortama maruz kaldığını ve seminal plazmanın membranlardan uzaklaşabildiğini bildirmişlerdir. Seminal plazmadaki koruyucu maddeler çoğunlukla proteinlerdir. Seminal plazma, koç ve boğa spermatozoonlarının motilitesini ve yaşama kabiliyetini artırır.<sup>17,30,31,40,50</sup> Motiliteyi stimüle eden bu faktörler, seminal plazmadaki düşük molekül ağırlıklı fraksiyonlardır.<sup>6</sup> Seminal plazma, spermatozoonların soğuk şokuna maruz kalma riskini azaltır,<sup>42,43</sup> membran hasarlarını önler<sup>4,5</sup> ve soğutmanın indüklediği kapasitasyon benzeri olayları engeller.<sup>32,49,56</sup> Seminal plazmanın yokluğunda ise kapasitasyon benzeri değişimler akrozom reaksiyonu ile sonuçlanır.<sup>39,49</sup>

Troedsson ve ark.<sup>55</sup> seminal plazmanın, sperma-

tozoonların dişi genital kanalında, transportunda ve canlılığını sürdürmesinde aktif rol oynadığını bildirmişler ve seminal plazmasız donma işlemi sonrası spermatozoon transportunun olumsuz yönde etkilediğini açıklamışlardır. Alghamdi ve Foster<sup>2</sup>, seminal plazmadaki DNAase enziminin, nütrofile ait DNA'ları sindirdiğini ve böylece daha fazla spermatozoonun ovidukta ulaşabildiğini bildirmişlerdir. Yudin ve ark.<sup>61</sup> seminal plazmadaki Beta-defensin 126 (DEFB126) proteinin, kapasitasyon tamamlana kadar sperma hücrelerinin yüzeylerini tamamen örttüğünü, kapasitasyon anında ya da kapasite olmuş spermatozoonlarda bu proteinin ortamdan uzaklaştırılması nedeniyle, spermatozoonların immün sistem tarafından hemen tanınarak elimine edildiğini ifade etmişlerdir.

Maxwell ve ark.<sup>32</sup>, eritilmiş koç spermasına %30 seminal plazma eklemişler ve intraservikal tohumlama sonrası kontrol ve seminal plazmalı gruplarda sırasıyla; %24,3 ve %60,0 gebelik saptamışlardır. Araştırmacılar seminal plazmanın eritme sonrası spermatozoonlarda oluşan olumsuzlukları önlediği ve dolayısıyla yüksek fertilitte oranlarının elde edildiğini açıklamışlardır.

Ollero ve ark.<sup>40</sup>, koç spermasında seminal plazmayı uzaklaştırmışlar, ayrılmış seminal plazmayı ya da >10 kDa seminal plazma içeren fraksiyonları ilave ederek Fisher sulandırıcısı ile spermayı dondurmuşlardır. Araştırmacılar her iki grupta da eritme sonrası spermatozoon canlılığının korunduğunu rapor etmişlerdir. Mortimer ve Maxwell<sup>36</sup> koçlarda seminal plazmanın spermatozoon membranlarına önemli derecede koruyucu etki gösterdiğini eritme sonrası kanıtlamışlardır.

Belibasaki ve ark.<sup>7</sup> donma öncesi koç sperma sulandırıcılarına (süt tozu) %50 seminal plazma ilavesinin tohumlama sonrası fertilitte oranlarını artırdığını bildirmişlerdir. Vadnais ve ark.<sup>56</sup> domuzlarda sperma sulandırıcısına katılan %20 seminal plazma ilavesinin soğutma ve eritme sonrası erken kapasitasyon oranlarını azalttığını saptamışlardır.

Sunulan çalışmada, koç sperma sulandırıcısına katılan seminal plazma ve soğutma öncesi gliserol ilavesinin, eritme sonrası spermatolojik özelliklere

etkisini saptamak amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Araştırmada canlı materyal olarak aynı bakım ve besleme koşullarında barındırılan, 4-6 yaşında sağlıklı altı baş Kıvırcık ırkı koç kullanıldı. Sperma alma çalışmaları Mart-Temmuz ayları içerisinde gerçekleştirildi.

### Seminal Plazmanın Hazırlanması

Altı adet kıvırcık ırkı koçtan elektroejakulator yardımıyla sperma alındı. Alınan spermalar pooling yapıldıktan sonra 5°C'de 12.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant aynı hız ve süre ile tekrar santrifüj edilip ardından süpernatant 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek hazırlanan seminal plazma 2 ml'lik eppendorf tüplerine aktarılıp -20°C'de saklandı.

### Süt Tozu Ana Sulandırıcısının Hazırlanması

11 g süt tozu (%1 yağlı) 100 ml distile suya tamamlanarak %11'lik (ağırlık/hacim) sulandırıcı hazırlandı ve ısıtma tablası yardımıyla 95°C'ye ısıtıldı ve 10 dakika bekletildikten sonra 26°C'ye soğutulmuş steril bir tülbent ile süzülde. Oda ısısında süt tozu sulandırıcısına %10 (hacim/hacim) yumurta sarısı ilave edildi ve homojenize edilerek 3000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta 0,03 g/100 ml penisilin, 0,04 g/100 ml streptomisin, 0,224 g/100 ml fruktoz ilave edildi. Hazırlanan sulandırıcı 14 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve çalışma gününe kadar -20°C'de depolandı. Süt tozu sulandırıcısına %10 gliserol ve %8 gliserol ilave edildi ve -20°C'de depolandı. Spermanın dondurulacağı gün, süt tozu sulandırıcısına %20 seminal plazma ilave edildi. %2 gliserollü sulandırıcının hazırlanması için süt tozu sulandırıcısına %2 gliserol ilave edildi ve %20 seminal plazma + %2 gliserollü sulandırıcının hazırlanmasında ise süt tozu sulandırıcısına %20 seminal plazma ve %2 gliserol ilave edildi. Elde edilen sulandırıcılar 26°C'de bekletildi. Sulandırma, soğutma, ekilibasyon ve eritme sonrası ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta (x40) motilite ve Hancock solüsyonunda 26 akrozomal morfoloji (x100) muayeneleri gerçekleştirildi.

## Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması

Pooling yapılan spermalar 26°C'de 1:1 oranında sulandırıldı. Sulandırılmış spermalar 0,3°C/dakika hızla 5°C'ye yavaşça soğutuldu. Bu amaçla sulandırılmış spermaya aynı hacimdeki gliserollü sulandırıcı 10 eşit hacimde ve 5'er dakika aralıklarla ilave edildi ve tüm gruplarda final sulandırma oranı 1:3, final gliserol oranı %5 oldu. Gliserolizasyon sonrası spermalar 5°C'de 2 saat ekilibrasyona bırakıldı ve 0,25 ml'lik payetlere çekilerek -110°C'de 7 dakika sıvı azot buharında donduruldu ve sıvı azot içerisinde -196°C depolandı. Donmuş sperma 37°C su banyosunda 30 saniyede eritildi ve spermatolojik özellikleri incelendi.

### Birinci Aşama:

Birinci aşamada soğutma öncesi düşük 1:1 sulandırma oranlarında ve final 1:3 sulandırma sonrası seminal plazma ve gliserol ilavelerinin etkileri araştırıldı.

**A1 Grubu:** Soğutma öncesi gliserol ve seminal plazma katkısız süt tozu sulandırıcısı ile sperma sulandırıldı ve gliserolizasyon işlemi %10 gliserollü sulandırıcı ile gerçekleştirildi (final seminal plazma oranı %0).

**A2 Grubu:** Sperma soğutma öncesi %20 seminal plazma içeren sulandırıcı ile sulandırma ve %10 gliserollü sulandırıcı ile gliserolizasyon işlemi yapıldı (seminal plazma oranı %10).

**A3 Grubu:** Sperma soğutma öncesi %2 gliserol içeren sulandırıcı ile sulandırıldı ve gliserolizasyon işlemi %8 gliserollü sulandırıcı ile gerçekleştirildi (seminal plazma oranı %0).

**A4 Grubu:** Sperma soğutma öncesi %20 seminal plazma ve %2 gliserol içeren sulandırıcı ile sulandırma ve %8 gliserollü sulandırıcı ile gliserolizasyon işlemi gerçekleştirildi (seminal plazma oranı %10).

Tüm gruplarda final sulandırma oranı 1:3 ve final gliserol oranı %5 oldu.

### İkinci Aşama:

Pooling sonrası sperma 2 eşit hacime ayrıldı ve her bir hacim 1:1 oranında sırasıyla süt tozu, süt tozu

+ %20 seminal plazmalı sulandırıcılar ile sulandırılarak B ve C ana grupları oluşturuldu. B gruplarında soğutma öncesi seminal plazma ilave edilmezken, C gruplarında bu aşamada %20 seminal plazma ilave edildi. Her bir grupta gliserolizasyon tamamlandıktan sonra, santrifüj işlemi ve seminal plazma ilavesinden oluşan toplam 8 grup oluşturuldu. Seminal plazma içermeyen süt tozu sulandırıcısı ile sulandırma ve soğutma sonrası sperma yüksek oranda (1:3, sulandırılmış sperma+gliserolizasyon sulandırıcısı) sulandırıldı.

**B1 Grubu:** Süt tozu sulandırıcısı ile sulandırma ve soğutma sonrası, %10 gliserollü sulandırıcı ile gliserolizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ekilibrasyon sonrası spermalara hiç bir işlem uygulanmadı.

**B2 Grubu:** Süt tozu sulandırıcısı ile sulandırma ve soğutma sonrası, %10 gliserollü sulandırıcı ile gliserolizasyon işlemi gerçekleştirildi. Gliserolizasyon sonrası %10 seminal plazma ilave edildi.

**B3 Grubu:** Süt tozu sulandırıcısı ile sulandırma ve soğutma sonrası, %10 gliserollü sulandırıcı ile gliserolizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ekilibrasyon öncesi spermalar santrifüje edildi ve üst kısımdan hacmin %50'si alındı. Böylece sulandırıcının oranı azaltılarak "yüksek tohumlama dozunu elde etmede kullanılabilirliğini belirlemek" amaçlandı.

**B4 Grubu:** Süt tozu sulandırıcısı ile sulandırma ve soğutma sonrası, %10 gliserollü sulandırıcı ile gliserolizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ekilibrasyon öncesi spermalar santrifüje edildi, üst kısımdan hacmin %50'si alındı ve %10 seminal plazma ilave edildi. Bu grupta santrifüj yardımıyla sulandırıcı oranının azaltılması sonrası, seminal plazma ilavesinin etkisi incelendi. Seminal plazma içeren süt tozu + seminal plazma sulandırıcısı ile sulandırma ve soğutma sonrası sperma, yüksek oranda (1:3, sulandırılmış sperma+gliserolizasyon sulandırıcısı) sulandırıldı.

**C1 Grubu:** Seminal plazma içeren süt tozu + seminal plazma sulandırıcısı ile sulandırma ve soğutma sonrası, %10 gliserollü sulandırıcı ile gliserolizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ekilibrasyon sonrası spermalara hiç bir işlem uygulanmadı.

**C2 Grubu:** Seminal plazma içeren süt tozu + seminal plazma sulandırıcısı ile sulandırma ve soğutma sonrası, %10 gliserollü sulandırıcı ile gliserolizasyon işlemi gerçekleştirildi. Gliserolizasyon sonrası %10 seminal plazma ilave edildi.

**C3 Grubu:** Süt tozu + seminal plazma sulandırıcısı ile sulandırma ve soğutma sonrası, %10 gliserollü sulandırıcı ile gliserolizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ekilibrasyon öncesi spermalar santrifüje edildi ve üst kısımdan hacmin %50'si alındı. Böylece soğutma öncesi seminal plazma varlığında sulandırıcının oranı azaltılarak "yüksek tohumlama dozunu elde etmede kullanılabilirliğini belirlemek" amaçlandı.

**C4 Grubu:** Süt tozu + seminal plazma sulandırıcısı ile sulandırma ve soğutma sonrası, %10 gliserollü sulandırıcı ile gliserolizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ekilibrasyon öncesi spermalar santrifüje edildi, üst kısımdan hacmin %50'si alındı ve %10 seminal plazma ilave edildi. Bu grupta santrifüj yardımıyla sulandırıcı oranının azaltılması sonrası, seminal plazma ilavesinin etkisi incelendi. Santrifüj işlemleri +5C°'lik ortamda soğuk santrifüjde (700 g'de) 10 dakikada gerçekleştirildi. İkinci ve üçüncü aşamalarda belirtilen tüm işlemler 10 kez tekrar edildi (n=10). Eritme sonrası ise her bir grup için 3 payet incelendi (n=30).

## İstatistiksel Analiz

Araştırmada elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıklarının belirlenmesinde tek-yön varyans analizi (ANOVA) ve farklılıklarının önem kontrolünde Duncan's Multiple Range testi, LSD ve t' testi SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı.

## BULGULAR

Birinci aşamada, en düşük motilite A3 grubunda ve en yüksek akrozomal bozukluklar yine A3 grubunda bulunmuştur (p<0,05). A1, A2 ve A4 gruplarında 5°C'de soğutma sonrası yüksek motilite oranları bulunurken, en düşük motilite A3 grubunda saptanmıştır (p<0,05). En yüksek akrozomal bozukluk oranları A1 ve A3 gruplarında bulunmuştur (Tablo 1).

Ekilibrasyon sonrası en düşük motilite A3 grubunda ve en yüksek akrozomal bozukluklar ise A1 ve A3 gruplarında saptanmıştır. Eritme sonrası ise en yüksek motilite A1 grubunda ve en düşük motilite oranı A3 grubunda (p<0,05) ve akrozomal bozukluklar en yüksek A1 grubunda ve en düşük A2 grubunda saptanmıştır.

İkinci aşamada, sulandırma ve soğutma sonrası motilite oranları benzer bulunmuş ve C grubunda akrozomal bozukluklar sulandırma sonrası ve

**Tablo 1.** Birinci aşamada gruplarda saptanan spermatolojik özellikler

Gruplar	A1	A2	A3	A4
<b>Sulandırma Sonrası (n=10)</b>				
Motilite (%)	86,0±1,23 <sup>a</sup>	87,0±1,53 <sup>a</sup>	77,0±2,26 <sup>b</sup>	83,0±1,53 <sup>a</sup>
Akrozom (%)	7,9±0,85 <sup>ab</sup>	4,1±0,48 <sup>c</sup>	8,4±0,56 <sup>a</sup>	6,2±0,77 <sup>b</sup>
<b>Soğutma Sonrası (n=10)</b>				
Motilite (%)	84,0±1,45 <sup>a</sup>	86,0±1,80 <sup>a</sup>	76,0±1,67 <sup>b</sup>	82,5±1,34 <sup>a</sup>
Akrozom (%)	11,2±1,07 <sup>ab</sup>	6,3±0,56 <sup>c</sup>	12,4±0,97 <sup>a</sup>	8,7±0,97 <sup>bc</sup>
<b>Ekilibrasyon Sonrası (n=10)</b>				
Motilite (%)	82,0±1,53 <sup>a</sup>	85,0±1,83 <sup>a</sup>	75,0±2,47 <sup>b</sup>	82,0±1,86 <sup>a</sup>
Akrozom (%)	17,9±1,10 <sup>a</sup>	8,0±0,89 <sup>c</sup>	17,7±1,03 <sup>a</sup>	11,9±0,50 <sup>b</sup>
<b>Eritme Sonrası (n=30)</b>				
Motilite (%)	53,0±1,11 <sup>a</sup>	44,5±1,57 <sup>b</sup>	29,5±1,89 <sup>c</sup>	45,5±0,90 <sup>b</sup>
Akrozom (%)	41,0±1,90 <sup>a</sup>	19,6±0,52 <sup>d</sup>	34,6±1,93 <sup>b</sup>	24,1±0,94 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup>Aynı satırda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir (p<0,05).



**Tablo 2.** İkinci aşamada B ve C ana grubun sulandırma ve soğutma sonrası saptanan spermatojolojik özellikler (n=10).

Gruplar	B		C	
	Sulandırma Sonrası	Soğutma Sonrası	Sulandırma Sonrası	Soğutma Sonrası
Motilite (%)	86,0±1,25	83,0±1,11	88,5±1,07	85,0±1,17
Akrozom (%)	8,2±0,53 <sup>a</sup>	13,0±0,37 <sup>a</sup>	5,1±0,43 <sup>b</sup>	8,5±0,62 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Aynı satırda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir (p<0,05).

**Tablo 3.** İkinci aşamada ekilibrasyon ve eritme sonrası saptanan spermatojolojik özellikler. Ekilibrasyon Sonrası (n=10)

Gruplar	B1	B2	B3	B4
	Motilite (%)	85,0±0,75 <sup>b</sup>	87,0±1,11 <sup>ab</sup>	66,0±1,25 <sup>c</sup>
Akrozom (%)	17,4±1,24 <sup>ab</sup>	11,9±1,02 <sup>c</sup>	20,3±0,99 <sup>a</sup>	13,4±1,31 <sup>c</sup>
Gruplar	C1	C2	C3	C4
Motilite (%)	87,0±1,11 <sup>ab</sup>	88,5±0,76 <sup>a</sup>	68,5±1,30 <sup>de</sup>	72,0±1,09 <sup>c</sup>
Akrozom (%)	11,3±0,94 <sup>c</sup>	13,2±1,41 <sup>c</sup>	19,0±0,61 <sup>a</sup>	14,5±1,16 <sup>bc</sup>
Eritme Sonrası (n=30)				
Gruplar	B1	B2	B3	B4
Motilite (%)	53,0±1,33 <sup>a</sup>	47,5±0,01 <sup>b</sup>	23,5±1,67 <sup>d</sup>	34,0±1,30 <sup>cd</sup>
Akrozom (%)	42,1±1,17 <sup>a</sup>	20,6±0,99 <sup>f</sup>	37,9±1,54 <sup>b</sup>	27,6±1,61 <sup>cd</sup>
Gruplar	C1	C2	C3	C4
Motilite (%)	47,0±1,70 <sup>b</sup>	48,5±1,67 <sup>b</sup>	30,5±1,17 <sup>d</sup>	37,0±1,11 <sup>c</sup>
Akrozom (%)	23,3±1,15 <sup>ef</sup>	21,5±1,12 <sup>ef</sup>	30,0±1,50 <sup>c</sup>	25,2±1,05 <sup>de</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup>Aynı satırda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir (p<0,05).

5°C'de B grubuna göre düşük bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 2).

Santrifüj ve seminal plazma ilavesi işlemlerinden sonra 2 saat ekilibrasyona bırakılan spermalarda saptanan motilite ve akrozomal bozukluklar Tablo 3'de gösterilmiştir. En yüksek motilite ve en düşük akrozomal bozukluk B2 grubunda saptanmıştır. C gruplarında ise en yüksek motilite C2 ve en düşük akrozomal bozukluk C1 ve C2 gruplarında saptanmıştır. Eritme sonrası B gruplarında en yüksek motilite B1 ve en düşük akrozomal bozukluk B2 grubunda saptanmıştır. C gruplarında en yüksek motilite ve düşük akrozomal bozukluk C1 ve C2 gruplarında saptanmıştır (Tablo 3).

## TARTIŞMA

Günümüzde koyunlarda suni tohumlama endüstrisi ve bilim alanında yapılan çalışmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Ancak eritilmiş

sperma ile yapılan servikal tohumlamalar, düşük kuzulama oranı ve fertilitate ile sonuçlanmaktadır. Uygun sperma sulandırıcıları, donma ve eritme aşamalarında spermatozoonları korurlar. Süt proteinlerinden laktalbüminle birlikte yumurta sarısının spermatozoonların motilite ve canlılığını artıran koruyucu etkiye sahip olduğu çoğu çalışmada bildirilmiştir.<sup>41,46,47</sup> Ancak fertilizasyonun başarısı için, eritme sonrası yeterli sayıda sperma hücresinin servikal bariyeri geçmesi zorunludur.<sup>11,41</sup> Servikal tohumlama için kabul edilebilir uygun tohumlama dozu 200x10<sup>6</sup> spermatozondur. Bu dozu ayarlamak için dondurma öncesi düşük sulandırma oranları veya yüksek oranda sulandırma sonrası santrifüj teknikleri kullanılmaktadır.<sup>21</sup>

En uygun gliserol konsantrasyonu, sulandırıcının ozmotik basıncına bağlıdır. Sulandırıcılarda; yumurta sarısı, süt ve antioksidan gibi koruyucu etkiye sahip maddelerin artırılması ve buna bağlı ola-

rak gliserol konsantrasyonunun %3,5, %2,5 ve %2,0 oranında kullanılması ile sperma başarıyla dondurulabilmektedir.<sup>48</sup> Soğutma ve dondurma süresince gliserol spermatozoon plazma membranının faz geçişini kısmen engelleyerek, membranın akışkanlığını ve su geçirgenliğini artırarak spermatozoonları koruyabilmektedir.<sup>38</sup> Koç spermasında 15°C'nin altındaki ısılar soğuk şoku için çok kritik olmasına rağmen, oda ısısında dahi spermatozoonlarda soğuk şokunun oluşabileceği belirtilmiştir.<sup>19</sup> Noiles ve ark.<sup>38</sup>, soğutma öncesi sulandırıcılara gliserol ilavesinin soğuk şokuna karşı sperma hücrelerini koruduğunu bildirmiştir. Gliserolün, sulandırıcıya 35°C, 30°C veya 5°C ısıda eklendiği zaman da koruyucu etki gösterdiği çoğu araştırmacının ortak görüşüdür.<sup>3,9,15,16,48</sup>

Düşük sulandırma oranlarında, eritme sonrası motilite ve morfolojik bütünlüğü sağlamadaki başarısızlıklar, sulandırıcı içerisinde bilinen koruyucu maddelerin yoğunluğunu değiştirme veya 5°C ye soğutma öncesi kısmi gliserol ilaveleri ile giderilmeye çalışılmıştır.<sup>21</sup> Anel ve ark.<sup>3</sup> koç spermasını 35°C'de %2 gliserol ilaveli TES-Tris-yumurta sarısı ile sulandırmışlar, eritme sonrası %55,18 motilite ve %23,3 akrozom bozukluğu bulduklarını, gliserol ilavesinin eritme sonrası motiliteye ve akrozomal bütünlüğe olumlu katkı yaptığını rapor etmişlerdir. Sunulan çalışmada, gliserol (%2) sulandırıcıya 26°C'de ilave edilmiş (A3), eritme sonrasına kadar tüm aşamalarda A1 grubuna göre daha düşük motilite saptanmıştır. Akrozomal bozukluklar ekilibasyon sonuna kadar A1 ve A3 gruplarında benzer olmuş, ancak soğutma öncesi gliserol içeren A3 grubunda daha yüksek eritme sonrası akrozomal bozukluk saptanmıştır. Gliserolün etkisine ilişkin elde edilen bulgular, yukarıda belirtilen çalışmalarla uyumlu değildir. Bulgular arasındaki zıtlık; sulandırıcılar arasındaki farklılıklara ve donma yöntemlerine bağlanabilir. Ancak Gil ve ark.<sup>23</sup> 15°C'de %3,2 gliserol içeren sulandırıcı ile sulandırdıkları koç spermasında, eritme sonrası daha düşük motilite ve daha yüksek akrozomal bozukluk saptamışlar, ilk gliserol ilavesinin 15°C'de gerçekleştirilmesinin spermatozoonlar için zararlı olduğunu bildirmişler-

dir. Critser ve ark.<sup>10</sup> 30°C gibi yüksek ısıda gliserol ilavesinin zararlı olduğunu, çünkü spermanın uzun süre gliserole 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. Gliserolün 30°C ve 5°C'de motiliteyi düşürdüğü<sup>26</sup> ve akrozom bozukluklarına neden olduğu<sup>24</sup> bildirilmiştir. Colas<sup>9</sup>, koç spermasını 30°C'de ve 4°C'de laktöz-yumurta sarısı-gliserol (%5) ile 1:4 oranında sulandırmış, 30°C'de gliserol ilavesinin spermatozoon motilitesini önemli derecede düşürdüğünü belirtmiştir.

Literatürlerden de anlaşılacağı üzere sulandırıcılara soğutma öncesi gliserol ilavesinin etkileri konusunda oldukça farklı görüşler bulunmaktadır. Gliserolün toksik etkisi sulandırıcının kompozisyonuna, gliserolizasyon yöntemlerine, soğutma ve donma hızına bağlı olarak değişmektedir.<sup>16,46</sup> Sunulan çalışmada sütlü sulandırıcılarda ve 1:1 sulandırma oranında, soğutma öncesi %2 gliserol ilavesinin zararlı etkisi bariz bir şekilde ortaya konmuş olup çoğu araştırmacının<sup>1,10,52,58</sup> bulgularını destekler niteliktedir.

Çalışmanın birinci (A1-A2 grupları) ve ikinci aşamasında (B ve C grupları) ilk sulandırma işlemindeki seminal plazma varlığı, spermatozoonun akrozomal bütünlüğün korunmasında olumlu katkı sağlamıştır. Sulandırma sonrası gruplar arasındaki farklılık sulandırma anında oluşabilen ozmotik şoklara<sup>8,9</sup> ve ortamdaki seminal plazma varlığının ozmotik basınçtaki ani değişiklikleri önlemesine<sup>49,52</sup> bağlanabilir. Seminal plazma yokluğunda spermanın sulandırılması sonrası kapasitasyon benzeri olayların şekillendiği ve akrozomal bozukluk oranlarında artışların kaydedildiği bildirilmiştir.<sup>49</sup> Koç ve boğalarda seminal plazmanın spermatozoon motilitesinin devamlılığında önemi bilinmesine rağmen<sup>6,30,41,50</sup> birinci aşamada A1 ve B1 gruplarında saptanan motilite oranları benzer bulunmuş, hatta eritme sonrası motilite, A2 grubunda daha düşük bulunmuştur. Halbuki seminal plazmanın motiliteyi stimüle eden düşük molekül ağırlığındaki fraksiyonları içerdiği<sup>6</sup> ve respirasyon oranının

yanı sıra motiliteyi de artırdığı bildirilmiştir.<sup>17</sup> Yine de A2 grubunda saptanan motilite oranlarının yüksek olduğu, özellikle akrozomal bulgular da dikkate alındığında tohumlama çalışmaları için başarılı sonuçların alınabileceği rahatlıkla ifade edilebilir.<sup>47,48</sup> Ayrıca ilk sulandırıcıdaki %2 gliserol (A3) varlığının toksik etkisi, seminal plazma ilavesi (A4) ile önemli oranlarda azaltılmıştır. Başka bir deyişle seminal plazmanın olumlu etkisini gliserol azaltmıştır. Birinci aşamada her iki katkı maddesinin etkileri saptanmış, gliserol ile seminal plazmanın bağımsız olarak spermatozoonlara zıt etki gösterdikleri bulunmuştur. Genel olarak bakıldığında, seminal plazmanın koç sperma hücrelerini donmanın zararlı etkilerine karşı koruduğu ve soğutma öncesi kısmi gliserol ilavesinin toksik etkisini azalttığı gözlenmiştir. Seminal plazmayı elde etmede kullanılan santrifüj ve filtrasyon işlemleri sonrası elde edilen düşük molekülülü fraksiyonların bu olumlu etkiye katkı sağladıkları ifade edilebilir.<sup>35</sup> Seminal plazmanın koruyucu etkisi, erken kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu önlemesi olarak açıklanmaktadır. Ortamdan seminal plazmanın uzaklaştırılması kapasitasyonu başlatabilir ve tekrar spermaya eklenmesi durumunda kapasitasyon ve benzeri olaylar önlenir. Koruyucu etkilerin, ya spermatozoon membranındaki proteinlerin kalıcı olmasına ya da önceden kaybolmuş membran proteinlerinin yerini seminal plazma proteinlerinin almasına bağlı olduğu düşünülmektedir.<sup>39,49</sup> Çalışmada, A2 ve A4 gruplarında donma prosesi süresince seminal plazmadaki koruyucu içeriklerin etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, birinci aşamada elde edilen bulgular doğrultusunda, soğutma öncesi sulandırıcılara gliserol ilave edilmemiş, soğutma öncesi seminal plazma varlığının, 5°C'de santrifüj işleminin ve santrifüj sonrası seminal plazma ilavesinin etkileri incelenmiştir. İlk sulandırmada (26°C) seminal plazma varlığı, ekilibasyon sonrası akrozomal bütünlüğü korumuş, ancak spermatozoon motilitesi etkilenmemiştir (B1-C1 grupları). Birinci aşamada elde edilen benzer bulgular, eritme sonrasında da saptanmış, soğutma öncesi seminal plazma ilavesi, donma ve eritme aşamalarında akrozomal

bütünlüğü korumada çok başarılı olmasına rağmen, motiliteye kısmen zarar vermiştir. Spermatozoonların uzun süre seminal plazmaya maruz kalmasının geri dönüşümsüz motilite kayıplarına neden olabileceği, spermayı oksidatif hasardan koruyan seminal plazma içeriklerinin zamanla etkisini kaybetmiş olabileceği düşünülebilir.<sup>6</sup>

İkinci aşamadaki gliserolizasyonda, sulandırma oranının artırılmasıyla belirgin avantajlar sağlanamamıştır. Prathalingan ve ark.<sup>45</sup> spermanın yüksek oranda sulandırılmasının donma sonrası önemli bir etki yapmadığı, fakat yüksek oranda sulandırma tekniğinin akrozomal bozukluk oranını arttırdığını bildirmişlerdir. Diğer yandan yüksek sulandırma oranının soğutma ve dondurma süresince meydana gelen kapasitasyon değişikliklerine neden olduğu açıklanmıştır.<sup>32,43,49</sup> Sunulan çalışmada ise seminal plazma varlığında sulandırma oranının artırılması yarar sağlamadığı gibi, tohumlama dozunu düşüreceğinden gereksiz bulunmuştur.

Soğutma 5°C seviyesindeyken sulandırıcılarda seminal plazma yokluğundan kaynaklanan akrozomal morfolojide gelişen olumsuzluklar, gliserolizasyon sulandırıcısına seminal plazma ilavesiyle telafi edilebilmiştir (B1, B2 grupları). Soğutma aşamasında kaybolmuş membran proteinlerinin yerini, seminal plazma proteinlerinin aldığı söylenebilir.<sup>39,49</sup> Seminal plazma yokluğunda meydana gelen bu kapasitasyon değişiklikleri akrozom hasarlı spermatozoon oluşumu ile sonuçlanır ki bu durum B1 ve B3 gruplarında açıkça kanıtlanmıştır. Vadnais ve ark.<sup>56</sup>, kapasitasyon benzeri gelişmelerin, seminal plazma eklenmesini takiben 10 dakika içerisinde önlendiği ve kapasite olmuş spermatozoonların seminal plazma ile inkübasyonu sonrasında sağlam hale geldiklerini bildirmişlerdir. Maxwell ve ark.<sup>31</sup>, seminal plazma etkisinin ilave edilme aşamasına (soğutma öncesi veya sonrası) ve oranına göre değişmediğini açıklamışlardır. Sunulan çalışmada da donma öncesi ve sonrası B1- B2 ve C1-C2 gruplarında saptanan spermatolojik özellikler, seminal plazmanın 26°C'de veya 5°C'de katılabileceğini ve her iki yöntemin de başarılı olduğunu göstermektedir.

Gliserolizasyon sonrası B3 ve C3 grupların-

da uygulanan santrifüj işlemi, spermatozoonların motilitesine ve akrozoma zarar vermiş, bu zarar, eritme sonrasında da saptanmıştır. Meydana gelen hasarlar, santrifüj işlemi sırasındaki mekanik etkilerden<sup>27,53</sup> ve/veya santrifüj sonrası üstte kalan hacmin %50'sinin alınmasından kaynaklanmış olabilir. Atılan süpernatantla seminal plazma ve diğer kriyoprotektantların azalması ve oranlarının değişmesi muhakkaktır. Ayrıca mekanik etki sırasında hücrelere bağlanmış seminal plazma proteinleri uzaklaşmış olabilir. Ayrıca santrifüj uygulaması 5°C süresince meydana gelen ölü spermatozoonların ROS (Reactive Oxygen Species) oluşumunu arttırdığı, yumurta sarılı medyumda aromatik amino oksidazı aktive edebildiği ve dolayısıyla yaşayan spermatozoonların canlılığını ve motilitesini azalttığı bildirilmiştir.<sup>51,54,57</sup>

Soğutma öncesi sulandırıcılarda seminal plazma varlığı, santrifüj işlemi sırasında motilitenin korunmasında başarılı olamamıştır. Ancak, ilk sulandırmadaki seminal plazmalı C3 grubunda eritme sonrası daha düşük (B3 grubuna göre) akrozomal bozukluk saptanmıştır. Soğutma öncesi seminal plazma varlığının olumlu etkisi santrifüj işlemi nedeniyle oldukça azalmış, yine de eritme sonrası morfolojinin korunmasında yararlı bulunmuştur. Santrifüj gruplarında en anlamlı sonuçlar, santrifüj sonrası seminal plazma ilavesi yapılmayan C3, C4 ve yapılan B4, C4 gruplarında elde edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası hacmin %50'si uzaklaştırılmış ve B4, C4 gruplarında %10 seminal plazma ilave edilmiştir. Santrifüj gruplarında eritme öncesi (72,0±1,09 motilite, 14,5±1,16 akrozomal bozukluk) ve sonrası (37,0±1,11 motilite, 25,2±1,05 akrozomal bozukluk) en başarılı sonuçlar B4 grubunda saptanmıştır. Santrifüj sonrası sulandırılmış spermaya seminal plazma ilavesinin son derece gerekli olduğu söylenebilir. Santrifüj sırasında hücre membranlarından seminal plazma proteinlerinin uzaklaşmış olabileceği<sup>27,44</sup> seminal plazma proteinlerinin spermatozoonlara bağlanarak hasarları onarabildiği<sup>42,52,60</sup> ve atılan süpernatantla seminal plazma miktarının azalmış olduğu gerçeği dikkate alınırse seminal plazmanın yararlı etkisi kolaylıkla anlaşılabilir.

## SONUÇ

Santrifüj işleminin seminal plazmanın etkisini azalttığı şüphesizdir. Ancak eritme sonrası B3 ve C3 grupları karşılaştırıldığında seminal plazmanın yararlı etkisinin tamamen yok olmadığı görülmektedir. Sütü sulandırıcılarda 5°C'ye soğutma öncesi sulandırıcılarda %2 gliserol varlığının, koç spermasının dondurulması aşamalarında zararlı olduğu ve bu zararın ortamda %20 seminal plazma varlığı ile azaldığı görülmüştür. Soğutma öncesi ve/veya 5°C'de sulandırıcılara seminal plazma ilavesinin sulandırma, soğutma ve dondurmanın zararlı etkilerine karşı spermatozoonları korumuş ve soğutma sırasında oluşan akrozomal bozuklukların, 5°C'de seminal plazma ilavesiyle azaltılabileceği, gliserolizasyonda yüksek oranlı sulandırma tekniğinin etkisiz ve gereksiz olduğu, tohumlama dozunu arttırmak amacıyla uygulanan santrifüj işleminin, spermatozoon akrozomuna ve motiliteye zarar verdiği ve santrifüj işlemi sonrası %10 seminal plazma ilavesinin bu zararları önemli oranlarda azalttığı saptanmıştır.

## ÖNERİLER

Süt tozu-yumurta sarısı sulandırıcısı ile dondurulan koç spermasına soğutma öncesi %20 seminal plazma ve 5°C'de santrifüj işleminden sonra %10 seminal plazma ilavelerinin önerilebileceği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Abdelhakeam A.A., Graham E.F and Vazquez I.A. (1991): Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol, *Cryobiology*, 28(1): 36-42.
2. Alghamdi A.S. and Foster D.N. (2005): Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps, *Biol. Reprod.*, 73(6): 1174-1181.
3. Anel L. et al. (2003): Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen, *Theriogenology*, 60(7): 1293-1308.
4. Barrios B., Fernandez-Juan M., Muino-Blanco T and Cebrian-Perez J.A. (2005): Immunocytochemical

- localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock, *J. Androl.*, 26(4): 539-549 (Abstr).
5. Barrios B. et al. (2000): Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane, *Biol. Reprod.*, 63(5): 1531-1537.
  6. Bass J.W., Molan P.C and Shannon P. (1983): Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa, *J. Reprod Fertil.*, 68(2): 275-280.
  7. Belibasaki S., Amiridis G.S., Lymberopoulos A., Varsakeli S and Kouskoura T. (2000): Ram seminal plasma and fertility: results from an ongoing field study, *Acta Vet. Hung.*, 48(3): 335-341.
  8. Choong C.H and Wales R.G. (1964): The effects of glycerol addition and equilibration on the revival of bull spermatozoa frozen in reconstituted skim milk, *Res. Vet. Sci.*, 5(2): 228-236.
  9. Colas G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen, *J. Reprod. Fertil.*, 42(2): 277-285.
  10. Critser J.K., Huse-Benda A.R., Aaker D.V., Arneson B.W and Ball G.D. (1988): Cryopreservation of human spermatozoa III: The effect of cryoprotectants on motility, *Fertil. Steril.*, 50(2): 314-320.
  11. Curry M.R., Kleinhans F.W and Watson P.F. (2000): Measurement of the water permeability of the membrane of boar, ram and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore, *Cryobiology*, 41(2): 167-173.
  12. D'Alessandro A.G and Martemucci A.G. (2005): 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.*, 4(2): 139-148.
  13. D'Alessandro A.G., Martemucci A.G., Collanna M.A and Bellitti A. (2001): Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition, *Theriogenology*, 55(5): 1159-1170.
  14. Duru N.K., Morshedi M. and Oehninger S. (2000): Effect of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa, *Fertil. Steril.*, 74(6): 1200-1207.
  15. El-Alamy M.A and Foote R.H. (2001): Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple extenders, *Anim. Reprod. Sci.*, 65(3-4): 245-254.
  16. Evans G and Maxwell W.M.C. (1987): Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats, Sydney, Butterworths. pp 19: 91-141.
  17. Fahy G.M. (1986): The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology, *Cryobiology*, 23(1): 1-13.
  18. Fewlass T.A., Sexton G.W. and Shaffiner C.S. (1975): Effect of various levels of egg yolk, milk and seminal plasma or blood serum on the respiration and reproductive efficiency of chicken spermatozoa, *Poult. Sci.*, 54(2): 346-349.
  19. Fiser P.S. and Fairfull R.W. (1986): Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa, *Theriogenology*, 25(3): 473-484.
  20. Fiser P.S and Fairfull R.W. (1986): The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing, *Cryobiology*, 23(6): 518-524.
  21. Fiser P.S and Fairfull R.W. (1989): The effects of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa, *Cryobiology*, 26(1): 64-69.
  22. Gil J., Lundeheim N., Söderquist L and Rodriguez-Martinez H. (2003): Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen, *Theriogenology*, 59(5-6): 1241-1255.
  23. Gil J., Rodriguez-Irazaqui M., Lundeheim N., Söderquist L and Rodriguez-Martinez H. (2003): Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination, *Theriogenology*, 59(5-6): 1157-1170.
  24. Gil J., Rodriguez-Irazaqui M., Söderquist L and Rodriguez-Martinez H. (2002): Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination, *Theriogenology*, 57(7): 1781-1792.
  25. Gökçen H. ve Aştı R.N. (1980): Sıvı azot buharında dondurma yönteminin çeşitli evrelerinde, koç spermatozoitlerindeki akrozom bozukluklarının saptanması, *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 27(3-4): 501-514.

26. Hancock J.L. (1952): The morphology of bull spermatozoon. *J Experimental Biology*, 29: 445-453.
27. Jones R.C. (1965): The use of dimethylsulfoxide, glycerol and reconstituted skim milk for the preservation of ram spermatozoon. II. The influence of diluent composition and processing time during freezing to minus -79°C with dimethyl sulfoxide or glycerol or both compounds, *Aust. J. Biol. Sci.*, 18(4): 887-900.
28. Katkov I.I. and Mazur P. (1998): Influence of centrifugation regimes on motility, yield and cell association of mouse spermatozoa, *J. Androl.*, 19(2): 232-241 (Abstr).
29. Maxwell W.M.C and Evans G. (2000): Recent development in artificial insemination of sheep and goats with semen stored in chilled liquid or frozen state, In: :proceedings 14<sup>th</sup>- International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, vol, 1, p.268.
30. Maxwell W.M.C and Watson P.F. (1996): Recent progress in the preservation of ram semen, *Anim. Reprod. Sci.*, 42(1-4): 55-65.
31. Maxwell W.M.C. et al. (1999): Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma, *Reprod. Fertil. Dev.*, 11(2): 123-126.
32. Maxwell W.M.C., Long C.R., Johnson L.A., Dobrinski J.R and Welch G.R. (1998): The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma, *Reprod. Fertil. Dev.*, 10(5): 433-440.
33. Maxwell W.M.C., Welch R and Johnson L.A. (1996): Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma, *Reprod. Fertil. Dev.*, 8(8): 1165-1178.
34. Medeiros C.M.O., Forell F, Oliveira A.T and Rodrigues J.L. (2002): Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?, *Theriogenology*, 57(1): 327-344.
35. Morrier A., Castonguay F and Bailey J.L. (2003): Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa, *Can. J. Anim. Sci.*, 82(3): 347-356.
36. Mortimer S.T. and Maxwell W.M.C. (2004): Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa, *Reproduction*, 127(2): 285-291.
37. Nauc V and Manjunath P. (2000): Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2., BSP-A3., BSP-30-kilodaltons) and their quantification in seminal plasma and sperm, *Biol. Reprod.*, 63(4): 1058-1066.
38. Noiles E.E., Bailey J.L and Storey B.T. (1995): The temperature dependence in the hydraulic conductivity,  $L_p$ , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4°C and 0°C, *Cryobiology*, 32(3): 220-238.
39. Oliphant G., Reynolds A.B and Thomas T.S (1985): Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction, *Am. J. Anat.*, 174(3): 269-283.
40. Ollero M., Cebrian-Perez J.A. and Muino-Blanco T. (1997): Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma, *J. Androl.*, 18(6): 732-739.
41. Ollero M., Perez-Pe R., Muino-Blanco T and Cebrian-Perez J.A. (1998): Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, 37(1): 1-12.
42. Perez-Pe R., Cebrian-Perez J.A and Muino-Blanco T. (2001): Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa, *Theriogenology*, 56(3): 425-434.
43. Perez-Pe R., Barrios B., Cebrian-Perez J.A and Muino-Blanco T. (2002): Seminal plasma proteins reduce protien tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa, *Mol. Reprod. Dev.*, 61(2): 226-233.
44. Pickett B.W., Sullivan J.J., Byers M.S., Pace M.M and Remmenga E.E. (1973): Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa, *Fertil. Steril.*, 26(2): 167-174.
45. Prathalingam N.S., Holt W.V., Revell S.G., Jones S and Watson P. F. (2006): Dilution of spermatozoa results in improved viability following a 24 hours storage period but decreased acrosome integrity following cryopreservation, *Anim. Reprod. Sci.*, 91(1-2): 11-22.
46. Salamon S and Maxwell W.M.C. (1995): Frozen storage of ram semen. I. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination, *Anim Reprod Sci*, 37: 185-249.

47. Salamon S and Maxwell W.M.C. (1995): Frozen storage of ram semen. II: Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement, *Anim. Reprod. Sci.*, 38(1): 1-36.
48. Salamon S ve Maxwell W.M.C. (2000): Storage of ram semen, *Anim. Reprod. Sci.*, 62(1-3): 77-111.
49. Schembri M.A., Major D.A., Suttie J.J., Maxwell W.M.C and Evans G. (2002): Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process, *Reprod. Fertil. Dev.*, 14: 225-233.
50. Schöneck C., Braun J. and Einspanier R. (1996): Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation, *Theriogenology*, 45(3): 633-642.
51. Shannon P and Curson B. (1972): Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen, *J. Dairy Sci.*, 55(5): 614-620.
52. Slavik T. (1987): Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs, *J. Reprod. Fertil.*, 79(1): 99-103.
53. Söderquist L., Lundeheim N and Nilsson B. (1999): Assessment of fertility after using different procedures to thaw ram spermatozoon frozen in mini straws, *Reprod. Dom. Anim.*, 34(2): 61-66.
54. Söderquist L., Madrid-Bury N and Rodriguez-Martinez H. (1997): Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures, *Theriogenology*, 48(7): 1115-1125.
55. Troedsson M.H. et al. (2005): Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination, *Anim. Reprod. Sci.*, 89(1-4): 171-186.
56. Vadnais M.L., Kirkwood R.N., Tempelman R.J., Sprecher D.J and Chou K. (2005): Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay, *Anim. Reprod. Sci.*, 87(1-2): 121-132.
57. Wang A.W., Zhang H., Ikemoto I., Anderson D.J and Loughlin K.R. (1997): Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation, *Urology*, 49(6): 921-925.
58. Watson P.F. (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoon and the assessment of their post-thawing function, *Reprod. Fertil. Dev.*, 7(4): 871-891.
59. Windsor D.P. (1997): Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of merino ewes, *Anim Reprod. Sci.*, 47(1-2): 21-29.
60. Yanagimachi R. (1994): Mammalian fertilization, In: Kneib, E., Neill, J.D. (ed). *The physiology of Reproduction*, Vol, 1, 2nd ed. New York, Raven Press, p.189-317.
61. Yudin A.I. et al. (2005): Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies, *Biol. Reprod.*, 73(6): 1243-1252.