



Boğa ve Alabalık Seminal Plazmasının Koç Spermasının Dondurulması Üzerine Etkisi

Selim ALÇAY, M.Kemal SOYLU, Burcu ÜSTÜNER

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama AD, Bursa-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışma, farklı oranlarda eklenen boğa (BSP) ve alabalık seminal plazmasının (ASP) koç spermasının dondurulabilirliği üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı. Çalışmada hayvan materyali olarak 2-3 yaşlı beş baş Kıvırcık ırkı koç kullanıldı. Aşım sezonu dışında koçlardan elektroejakülatörle haftada bir kez olmak üzere üç kez sperma alındı. Spermatolojik özellikler incelendikten sonra en az +++ kitle hareketi ve >%70 motiliteye sahip sperma örnekleri birleştirildi (pooling). Sperma, final konsantrasyonu 1/5 (sperma/sulandırıcı) olacak şekilde %15 ve %30 alabalık seminal plazması %15 ve %30 boğa seminal plazması ve seminal plazma içermeyen (kontrol) sulandırıcılarla iki aşamalı sulandırma yöntemi kullanılarak sulandırıldı. Ekilibre edilen sperma 0.25 ml'lik payetlerde donduruldu. Sperma örneklerinin gliserolsüz sulandırıcı (sulandırıcı A) ile sulandırıldıktan sonra, 5°C'a soğutulduğunda, ekilibrasyon ve eritme sonrası motilite ve morfolojik bozukluk oranları belirlendi. Dondurma ve eritme aşamalarının spermanın motilite ve akrozomal bütünlüğü üzerinde negatif etkisinin olduğu saptandı ($P<0.05$). Eritme sonrası en düşük motilite %15 ve %30 ASP ile dondurulan gruplarda gözlemlenirken, %15 ve %30 BSP gruplarının eritme sonrası motilitesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Eritme sonrası kontrol grubu akrozomal bozukluk oranlarının, diğer gruplara göre düşük olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Sonuç olarak, boğa seminal plazmasının koç spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcılara katkısının eritme sonrası spermatolojik özellikleri artırabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Koç, kriyopreservasyon, seminal plazma

The Effect of Bull and Trout Seminal Plasma on Ram Semen Cryopreservation

Summary: This study was carried out to investigate the effect of bull and trout seminal plasma added at the different ratios on the freezability of ram semen. In this study, 2-3 years old 5 Kıvırcık rams were used. During the non-breeding season, sperm was obtained from rams once per a week (totally three times) by means of electroejaculator. After investigating the spermatological characteristic, sperm samples which have at least >+++ wave motion and >70% initial motility were pooled in one tube (pooling). Sperm was diluted to a final concentration of 1/5 (semen/extender) in 15% and 30% trout seminal plasma (TSP), 15% and 30% bull seminal plasma (BSP) and no seminal plasma (control) using a two-step dilution method. The equilibrated semen was frozen in 0.25 ml straws. Semen samples were examined for sperm motility and morphological defect rates following dilution with extender A (non- glycerol) and cooled to 5°C, equilibration and thawing. Freezing and thawing procedures had negative effects on motility and acrosomal integrity ($P<0.05$). While the lowest post-thaw motilities were obtained as 15% and 30% in TSP groups ($P<0.05$), post-thaw motilities of 15% and 30% in BSP extender groups were higher than the control group. The post-thaw defective acrosome rates of control group were lower than the other groups ($P<0.05$). In conclusion, it was deduced that the addition of bull seminal plasma to the ram semen extender could improve the post-thaw spermatological characters.

Key Words: Cryopreservation, ram, seminal plasma

Giriş

Spermanın saklanması; suni tohumlama, embriyo transferi ve *in vitro* fertilizasyon gibi yardımcı üreme tekniklerinin geliştirilmesi türlerin korunması ve klinik çalışmalar amacıyla yapılmaktadır (20).

Spermanın dondurulması; motilite, canlılık ve dölleme yeteneğinde azalmaya neden olan bir seri yapısal, biyokimyasal ve işlevsel değişimlerin başlamasına neden olur (3, 9, 27). Sperma sulandır-

ma ve soğutma işlemlerinde ozmotik basınç ve/veya soğuk şoklarına maruz kalarak potansiyel fertilitasını önemli ölçüde yitirebilir. Çoğu araştırmacı koç spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcı ve protokoller geliştirmesine karşın fertilitate sonuçları hala taze sperma ve doğal çiftleşmeyle karşılaştırılamayacak düzeyde düşüktür (22, 25, 30, 31). Dölleme yeteneğindeki bu azalmalar, eritme sonrası düşen motilite oranına ve morfolojik bozukluklara özellikle de akrozomal bozukluklara bağlanmaktadır (21, 23-25, 31).

Sezonsal fotoperiyoda bağlı olarak, kimi bölgelerde koçların reproduktif aktivitelerinin etkilendiği

görülmektedir (12, 16). Eritme sonrası spermatolojik özelliklerin mevsime bağlı olarak olumsuz etkileneceğinin, donmuş koç sperması ile yapılan suni tohumlamaların başarısını sınırlandıran en önemli faktör olduğu bildirilmiştir (8, 14).

Sulandırıcılara eklenen farklı türlere ait seminal plazmaların, memeli spermasını dondurma prosedürünün olumsuz etkilerine karşı koruduğu birçok çalışmada belirtilmiştir (5, 7, 15, 29). Boğa seminal plazmasının, koçlarda lipid kompozisyonundaki plazma mebranın yapısını kriyopresevasyonun neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı koruduğu bildirilmektedir (4, 7, 26). Antarktik balıklarının soğuk ortama dirençli olmasının, donma sırasında şekillenen ve hücreye zarar veren buz kristallerinin oluşumunu modifiye eden antifriz proteinlerin varlığıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür (10).

Balık spermasının soğuk ortamda fertilitasını koruduğu düşünüldükten sonra balık ve boğa seminal plazması katkısının donmaya karşı duyarlı olan koç spermasının dondurulabilirliğini artırabileceği varsayılarak bu çalışmada; sulandırıcılara farklı oranlarda eklenen boğa ve alabalık seminal plazmasının aşım mevsimi dışında, koç spermasının dondurulabilirliği üzerine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvan materyali ve spermanın alınması

Çalışma Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı ve Hayvansal Üretim ve Uygulama Merkezi Koyunculuk Ünitesinde (enlem 40.1833°, boylam 29.0667°) yapıldı. Araştırmada hayvan materyali olarak 2-3 yaşlı beş adet Kıvrıkcık ırkı koç kullanıldı. Koçların bakım ve beslenmeleri bulundukları sürü içinde çiftliğin koşullarına göre yapıldı.

Araştırmada kullanılan ASP yetişkin alabalıklardan sağım yöntemi ile alındı. Buz kutularında sağlanan +4°C'lık taşıma koşullarıyla laboratuara getirilen alabalık sperması 3000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek seminal sıvısından ayrıldı ve seminal plazma -18°C'ta saklandı.

Boğa sperması Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı ve Hayvansal Üretim ve Uygulama Merkezi Sığırılık Ünitesinde bulunan 3 adet boğadan suni vajina yardımıyla alındı. Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarına getirilen sperma 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek seminal plazmasından ayrıldı ve seminal plazma örnekleri -18°C'ta saklandı (13, 15, 29). Sperma çiftleşme mevsimi dışında (Ocak-Şubat), sağlıklı ve normospermi özelliği gösteren koçlar-

dan elektroejakülatör yardımıyla alındı. Sperma alma işlemi haftada bir kez olmak üzere toplam üç kez yinelenildi.

Spermanın sulandırılması ve dondurulması

Spermanın dondurulmasında, sonuçta %6 gliserol içerecek şekilde hazırlanan Tris-sitrik asit-früktoz sulandırıcısı kullanıldı. Spermatolojik özellikler incelendikten sonra en az +++ kitle hareketi ve % 70 motiliteye sahip tüm sperma örnekleri bir tüpte birleştirildi (pooling). Pooling yapılan sperma kontrol grubu ayrıldıktan sonra 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek seminal plazmasından ayrıldı ve 4 eşit hacme bölündü. Daha sonra, sonuçta 1/5 sperma/sulandırıcı olacak şekilde %15 ve %30 alabalık seminal plazması (ASP), %15 ve %30 boğa seminal plazması (BSP) ve seminal plazma içermeyen (kontrol) Tris bazlı sulandırıcılarla (Tris: 2.168 g, sitrik asit:1.12 g, früktoz 0.8 g, trehaloz 1.52 g ve EDTA 0.06 g/ 80 ml distile su, %20 yumurta sarısı, final gliserol oranı %6) iki aşamalı sulandırma yöntemi kullanılarak sulandırıldı (22). Ekilibrasyon sonrası, sperma örnekleri 0.25 ml'lik payetlere çekildi ve sıvı azot buharında (-120°C) 10 dakika bekletilerek dondurulduktan sonra sıvı azot içinde (-196°C) depolandı.

Motilite ve morfolojik incelemeler; pooling, sulandırıcı A ile sulandırıldıktan, 5°C'a soğutulduktan, ekilibrasyonu tamamladıktan ve çözündürüldükten sonraki aşamalarda gerçekleştirildi. Eritme sonrası 3 payet değerlendirmeye alınarak ortalama spermatolojik değerleri saptandı.

Çalışma süresince spermatolojik muayeneler bu konuda deneyimi olan aynı araştırmacı tarafından gerçekleştirildi. Sperma motilitesi, 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopun x40 büyütmesinde lam-lamel arasına damlatılan sperma örneğinde en az 3 mikroskop sahasına bakılarak yapıldı. Hancock sıvısına aktarılan sperma örneğinin faz kontrast mikroskopun immersiyon objektifinde incelenmesi sonucu, akrozomal bozukluk ve diğer morfolojik bozukluk oranları (baş, orta, kuyruk) saptandı ve % olarak değerlendirildi (29).

İstatistik analizler

Araştırmada elde edilen bulgular karşılaştırılmalı olarak değerlendirilerek, istatistiksel önemleri Kruskal Wallis ve tek yönlü varyans analizi testleri ile saptandı. Tek yönlü varyans analizinde anlamlı çıkan değişikliklerin çoklu karşılaştırmasında Tukey HSD testi, Kruskal Wallis'de ise Mann Whitney U testi yapıldı. Mann Whitney U testi yapılan gruplarda Bonferroni düzeltmesi uygulandı (P<0.05).

Bulgular

Sunulan çalışmada taze spermada motilite, akrozomal bozukluk ve diğer morfolojik bozukluklara (DMB) ait ortalama spermatolojik değerler sırasıyla 71.7 ± 1.7 , 3.8 ± 0.3 ve 5.0 ± 0.5 olarak belirlendi. Sperma örneklerinin sulandırıcı A ile sulandırıldığında, 5°C'ta, ekilibrasyon ve eritme sonrası aşamalarda tespit edilen motilite ve morfolojik bozukluk oranları Tablo 1, 2, 3 ve 4'te; sulandırıcı gruplarına ait eritme sonrası motilite ve akrozomal bozukluk oranları ise Şekil 1 ve 2'de sunulmuştur

Dondurma (sulandırma, 5°C'a soğutulduğunda ve ekilibrasyon) ve eritme aşamalarının spermanın motilitesi ve akrozomal bütünlük üzerinde negatif bir etkisinin olduğu saptandı ($P < 0.05$).

Spermanın sulandırma sonrası, 5°C'ta ve ekilibrasyon sonrasındaki aşamalarda motilite oranları karşılaştırıldığında, %15 ve %30 BSP içeren grupların motilite oranları istatistiksel anlamda yüksek bulundu ($P < 0.05$). Eritme sonrası motilite değerlendirmelerinde; %15 ve %30 BSP gruplarının motilitelerinin yüksek olduğu, %15 ve %30 ASP

Tablo 1. Sulandırma sonrasında saptanan spermatolojik bulgular

Gruplar	n	Motilite (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Akrozomal Bozukluk Oranı (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	D.M.B. Oranı (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
Kontrol	3	70.0 ± 1.6^a	7.3 ± 0.3	5.0 ± 0.5
% 15 ASP	3	45.0 ± 2.8^b	7.3 ± 0.3	6.0 ± 0.6
% 30 ASP	3	45.0 ± 2.8^b	7.6 ± 0.6	9.7 ± 1.0
% 15 BSP	3	65.0 ± 0.0^a	7.7 ± 0.9	9.0 ± 0.5
% 30 BSP	3	65.0 ± 2.8^a	8.0 ± 0.6	6.3 ± 0.3

Önem Kontrolü
(Kruskal- Wallis Test)

$P < 0.05$

$P > 0.05$

$P > 0.05$

^{a, b, c}: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan değerler arası farklılıklar önemlidir ($P < 0.05$).

Tablo 2. 5°C'de saptanan spermatolojik bulgular

Gruplar	n	Motilite (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Akrozomal Bozukluk Oranı (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	D.M.B. Oranı (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
Kontrol	3	60.0 ± 1.6^a	9.0 ± 0.6^a	6.0 ± 0.6
% 15 ASP	3	23.3 ± 1.7^b	14.3 ± 0.9^b	5.7 ± 0.3
% 30 ASP	3	21.7 ± 1.7^b	15.0 ± 0.6^b	6.3 ± 0.3
% 15 BSP	3	61.7 ± 1.6^a	9.3 ± 0.3^a	6.0 ± 0.6
% 30 BSP	3	56.6 ± 1.6^a	8.0 ± 1.2^a	6.6 ± 0.9

Önem Kontrolü
(Kruskal- Wallis Test)

$P < 0.05$

$P < 0.05$

$P > 0.05$

^{a, b, c}: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan değerler arası farklılıklar önemlidir ($P < 0.05$).

Tablo 3. Ekilibrasyon sonrası saptanan spermatolojik bulgular

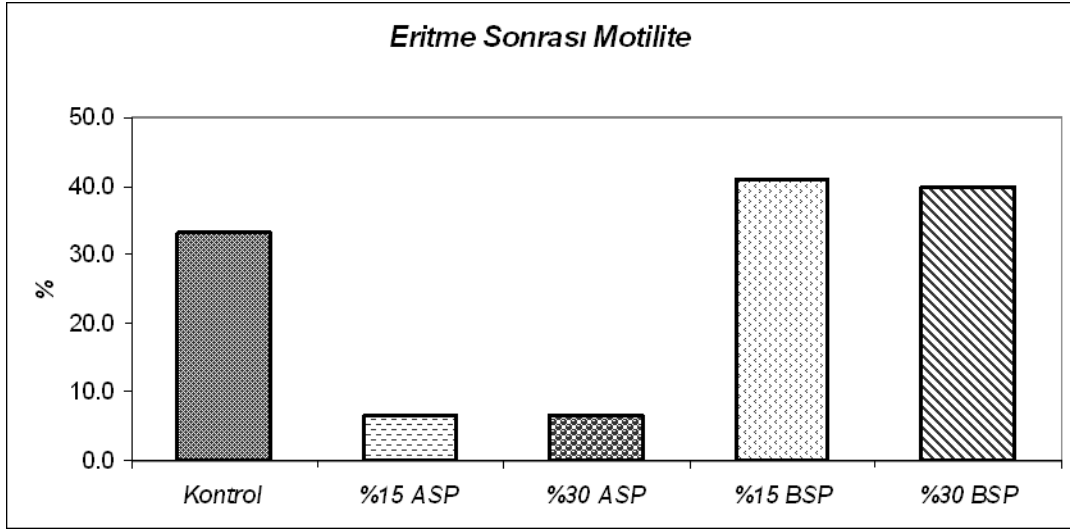
Gruplar	n	Motilite (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Akrozomal Bozukluk Oranı (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	D.M.B. Oranı (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
Kontrol	3	48.3±1.7 ^a	13.0±1.0 ^a	10.0±0.6
% 15 ASP	3	10.0±0.0 ^b	21.7±1.5 ^b	9.0±1.1
% 30 ASP	3	11.6±1.6 ^b	22.0±1.2 ^b	8.0±1.2
% 15 BSP	3	46.7±1.7 ^a	15.7±0.8 ^{ab}	9.7±1.2
% 30 BSP	3	48.3±1.6 ^a	13.0±1.0 ^a	9.0±0.6
Önem Kontrolü (Kruskal- Wallis Test)		P<0.05	P<0.05	P>0.05

^{a, b, c}: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan değerler arası farklılıklar önemlidir (P<0.05).

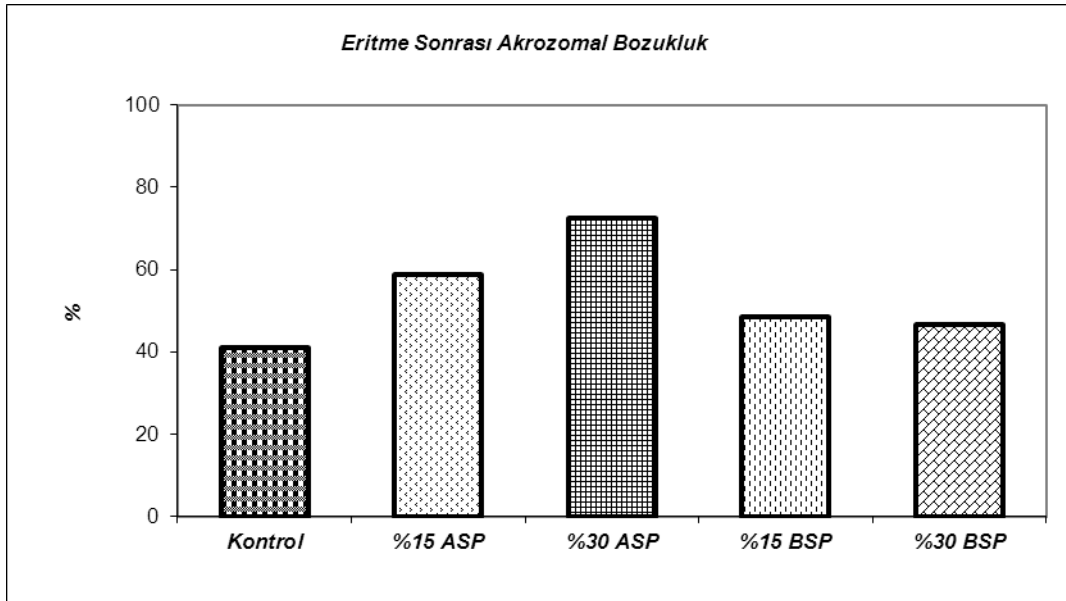
Tablo 4. Çözüm sonrası saptanan spermatolojik bulgular

Gruplar	n	Motilite (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Akrozomal Bozukluk Oranı (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	D.M.B. Oranı (%) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
Kontrol	9	33.3±0.8 ^a	41.0±1.0 ^a	4.8±1.2
% 15 ASP	9	6.60±0.3 ^b	58.8±0.3 ^b	4.6±0.9
% 30 ASP	9	6.60±1.4 ^b	72.6±1.3 ^c	4.1±1.1
% 15 BSP	9	41.1±0.7 ^a	48.4±1.6 ^{ab}	4.4±0.9
% 30 BSP	9	40.6±0.6 ^a	46.6±4.4 ^{ab}	4.6±0.3
Önem Kontrolü (Tek Yönlü Varyans Analizi)		P<0.05	P<0.05	P>0.05

^{a, b, c}: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan değerler arası farklılıklar önemlidir (P<0.05).



Şekil I. Çözüm sonrasında saptanan motilite değerleri



Şekil II. Çözüm sonrasında saptanan akrozomal bozukluk oranları

gruplarının motilitelerinin ise diğer gruplara göre istatistiksel önemde daha düşük olduğu saptandı ($P < 0.05$).

5°C, ekilibasyon ve eritme sonrası akrozomal bozukluk oranları değerlendirildiğinde, %30 ASP'nin akrozomal bozukluk oranlarını artırdığı ($P < 0.05$), kontrol grubunda ise diğer gruplara göre akrozomal bozukluğun daha düşük olduğu belirlendi.

Sulandırma sonrası, 5°C'ta, ekilibasyon sonrası ve eritme sonrası her bir aşama kendi içinde DMB oranları bakımından karşılaştırıldığında, sulandırma sonrası %15 BSP ile %30 ASP grupları dışında istatistiksel fark bulunmadı ($P > 0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Dondurma ve eritme işleminin memeli spermasının viabilitesi, DNA ve fonksiyonel bütünlüğü üzerine negatif etkisi vardır (18, 22, 30). Özellikle koç sperması diğer çiftlik hayvanları ile karşılaştırıldığında dondurmaya karşı en duyarlı olanıdır (1, 2). Koç spermasında eritme sonrası motilite oranı en fazla %40-60 elde edilmesine karşın, bunların ancak %20-30'u biyolojik olarak işlevseldir (20). Bu yüzden koç spermasının dondurulmasında eritme sonrası sperma kalitesini artırmak için farklı sulandırıcılar, seminal plazma katkıları, kriyoprotektanlar ve dondurma hızları denenmektedir (6, 22, 29).

Memeli spermasının dondurulmasında ilerleme kaydedilmesine karşın, koç spermasını dondurma başarısı boğa spermasına göre daha düşüktür (22, 32). Kriyopreservasyon spermatozoon motilitesini ve akrozom bütünlüğünü düşürmektedir (1, 2, 22, 30). Sunulan çalışmada, dondurma-eritme işleminin (5°C'a soğutma, sulandırma, ekilibrasyon ve eritme) motiliteyi ve akrozomal bütünlük oranlarını negatif yönde etkilemediği gözlemlendi ($P<0.05$). Sulandırma sonrası, 5°C, ekilibrasyon ve eritme sonrası aşamalarda %15 ve %30 ASP gruplarının motilite oranları istatistiksel anlamda diğer gruplara göre daha düşük bulundu ($P<0.05$).

Alabalık seminal plazmasının koç spermasına ilavesinin olumsuz etkilerinin nedenini kesin olarak açıklamak için ayrıntılı araştırmalara gerek vardır. Bununla birlikte alabalık ve boğa seminal plazmalarının koç spermasının dondurulması üzerinde farklı etkilerinin olması ortamdaki osmotik basınç farklılığına, seminal plazma içeriğinde bulunan makromoleküllerin varlığına ve oranına, boğa ve alabalık seminal plazmaları ile yumurta sarılı sulandırıcılar arasındaki ilişkilere bağlanabilir (13, 29).

%15 ve %30 BSP gruplarının eritme sonrası motiliteleri kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına karşın, aralarındaki farkın istatistiksel yönden önemli olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

Seminal plazma, spermatozoanın yaşama yeteneği ve motilitesini etkileyen çok çeşitli bileşenleri içeren karmaşık bir yapıdır. Sadece tür bazında değil, farklı fertilititeye sahip boğaların da seminal plazma proteinlerinin farklı olduğu saptanmıştır (7). Boğa seminal plazması proteinlerinin koç spermasına yararlı etkisi, spermatozoanın kapasitasyon benzeri ısı şokunun neden olduğu kimi yüzey değişikliklerini membran stabilizasyonunu sağlayarak engellemesi şeklinde gerçekleşir (11). Boğa seminal plazmasının katılması; sulandırma, 5°C'ta, ekilibrasyon ve eritme sonrası motilite ve akrozomal bütünlüğünü olumlu yönde etkilemiştir. Bu veriler, BSP katılmasının koç spermasının lipid peroksi-

dasyonunu önlediğini ve motilite ile akrozomal bütünlüğü koruduğunu belirten yayınlarla benzerlik göstermektedir (4, 5, 7, 26). Sunulan çalışmada, 5°C'ta %15 ve %30 BSP gruplarının motilite oranları Soylu (29)'nun aşım mevsimi içinde farklı oranlarda BSP katılan grupların 5°C'taki motilite değerlerinden oldukça düşük çıkmıştır.

Gökdağ'ın (13) aşım mevsimi içinde kontrol, %20 ve %40 ASP ile sulandırdığı grupların 5°C'taki motilite değerleri, bu çalışmada kontrol ve ASP gruplarının motilite değerlerinden yüksektir.

Günay ve ark.(15), %20 boğa seminal plazması katarak dondurdıkları koç spermasının eritme sonrası motilitelerini kontrol grubuna göre daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada %15 ve %30 BSP gruplarının eritme sonrası motilitelerinin kontrol grubuna göre yüksek olması Günay ve ark.'nın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Baran ve ark. (5)'nin %15 BSP ile dondurdıkları sperma örneklerinin eritme sonrası motilite değerleri ise sunulan çalışmanın %15 ve %30 BSP gruplarının eritme sonrası motilite değerlerinden düşük bulunmuştur.

Kriyopreservasyon, premature kapasitasyon ve akrozom reaksiyonlarını indüklemektedir (22). Koç sperması ile yapılan çoğu çalışmada eritme sonrası akrozomal bozukluk oranları %45-65 arasında saptanmıştır (1, 5, 15, 22, 30). Sunulan çalışmada da akrozomal bütünlük dondurma işlemlerinden olumsuz yönde etkilenmiştir ve Nur ve ark. (22)'nin verileriyle uyumaktadır ($P<0.05$).

Akrozomal bozukluk oranını belirlemek amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır (22, 29, 30). Flow cytometri yönteminde, akrozoma spesifik floresan boyalarla objektif olarak, kısa süre içinde çok sayıda spermatozoon değerlendirilir. Gimza boyama yöntemi gibi mikroskopi tekniğine dayalı yöntemlerde değerlendirilen spermatozoon sayısının daha az olması ve subjektif bir değerlendirmenin yapılması sonuçları oldukça etkilemektedir. Sunulan çalışmada 5°C'ta kontrol grubunda Gimza boyama yöntemi ile tespit edilen akrozomal bozukluk oranları Nur ve ark. (22) ile uyumluluk göstermektedir.

Sunulan çalışmada 5°C, ekilibrasyon ve eritme sonrası akrozomal bozukluk oranları değerlendirildiğinde, ASP'nin diğer gruplara göre akrozomal bütünlüğü koruyamadığı ve %30 ASP'nin %15 ASP'na göre daha zararlı olduğu ($P<0.05$) Gökdağ'ın (13) bulguları ile uyumludur. Bu çalışmada seminal plazma katılan grupların, santrifüj edilmeden kontrol grubunun akrozomal bozukluk oranından yüksek çıkması, spermanın sulandırma öncesinde santrifüj edilmesine de bağlanabilir (19).

Mevsimsel fotoperiyoda bağlı olarak, kimi bölgelerde koçların reprodüktif aktivitelerinin etkilendiği bildirilmektedir (12, 16). Araştırmacılar, spermanın alındığı mevsimin ve bireysel farklılığın eritme sonrası spermatolojik özellikler ile *in vivo* ve *in vitro* fertilité üzerine etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (9, 17, 28). Eritme sonrası motilité ve akrozomal bütünlük oranlarının düşük bulunması, sunulan çalışmanın çiftleşme mevsimi dışında yapılmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, hangi oranda olursa olsun, ortamda alabalık seminal plazmasının, boğa seminal plazması gibi motilité ve akrozomal bütünlüğü korumada etkin olmadığı saptanmıştır. Koç spermasının dondurulabilirliğinin başarısını artırmada, sulandırıcıya katılan boğa seminal plazmasının katkısı hakkında daha net bir sonuca varmak için, bu konuda daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına gereksinim olduğu düşünülmüştür.

Kaynaklar

1. Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA. Studies on the 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* 1991; 28: 36-42.
2. Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA, Chaloner KM. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. Development of an extender for freezing: effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars and the method of dilution. *Cryobiology* 1991; 28: 43-9.
3. Ak K, Baran A, Soylu MK, İleri İK. The effect of addition of bull seminal plasma to the ram semen extenders on spermatological characteristics after thawing. Ninth National Conference Modern Tendencies in the Development of Fundamental and Applied Sciences. June, 4-5, 1998; Stara Zagora- Bulgaria.
4. Asworth PJC, Harrison RAP, Miller NGA, Plummer JM, Watson PF. Survival of ram spermatozoa at high dilution: Protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Develop* 1994; 6: 173-80.
5. Baran A, Ak K, İleri İK., Soylu MK. Effects of adding bull seminal plasma to ram semen extenders on post-thaw spermatozoa motility and morphology. *Indian Vet J* 2004; 81: 780-3.
6. Barbas JP, Baptista MC, Horta AEM. Comparison of two freezing methods for Merino Regional and Serra da Estrela ram semen. *Rev Port Cienc Veterinarians* 2005; 100: 53- 60.
7. Barrios B, Perez-Pe R, Gallego M, Tato A, Osada J, Munio-Blanco T, Cebrian-perez JA. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 2000; 63: 1531-7.
8. Colas G, Brice G. Seasonal variations of the fertilizing capacity of deep-frozen ram semen. *Proceeding of the Eighth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. July, 12, 1976; Crakow- Poland.
9. D'Alessandro AG, Martemuccig G, Colonna MA, Bellitti A. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as effected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology* 2001; 55: 1159-70.
10. Devries AL, Wohlschlag DE. Freezing resistance in some Antarctic fish. *Science* 1969; 163: 1074- 5.
11. García-López N, Ollero M, Cebrián-Pérez JA, Muño-Blanco T. Reversion of thermic-shock effect on ram spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueoustwo-phase systems. *J Chromatogr B Biomed App* 1996; 680: 137-43.
12. Glover TD, D'Occhio MJ, Millar RP. Male life cycle and seasonality. *Lamming GE eds. In: Marshall's Physiology of Reproduction. London: Churchill Livingstone, 1990; pp. 213-378.*
13. Gökdağ M. Alabalık Seminal Plazmasının Koç Spermasının Spermatolojik Özellikleri ve Viabilitesi Üzerine Etkisi. Doktora Tezi. Uludağ Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Programı. Bursa-Türkiye, 2006.
14. Guerin Y, Cognie Y, Poulin N. Freezability of freshly ejaculated and frozen ram semen in vitro. *Twelfth International Congress on Animal Reproduction*. August, 23-27, 1992; Hague-Netherlands.
15. Gunay U, Ibrahim D, Nur Z, Manolov I, Sagirkaya H, Soylu MK, Kaptan C, Akpınar L. Influence of bull seminal plasma on post-thaw ram semen parameters and fertility. *Bull Vet Inst Pulawy* 2006; 50: 503-7.

16. Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Rumin Res* 2000; 3: 125-30.
17. Marquess CC, Barbas JP, Baptista MC, Cannas Serra CC, Vasques MI, Pereira R, Cavaco Gonçalves S, Horta AEM. Reproduction in the ovine Saloia breed: seasonal and individual factors affecting fresh and frozen semen performance, in vivo and in vitro fertility. *Animal products from the Mediterranean area*. September, 25-27, 2005; Vale de santarem-Portugal.
18. Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 2004; 71: 28-37.
19. Matás C, Decuadro G, Martinez-Miro S, Gadea J. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology* 2007; 67: 1087-91.
20. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 2002; 57: 327-44.
21. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell electrophoresis (COMET assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17: 990-8.
22. Nur Z, Zik B, Ustuner B, Sagirkaya H, Ozguden CG. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology* 2010; 73: 1267-75.
23. Ollero M, Perez-PE R, Muino-Blanvo T, Cebrian-Perez JA. Improvement of ram semen cryopreserved protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology* 1998; 37: 1-12.
24. Perez-Pe R, Grasa P, Fernandez-Juan M, Peleato ML, Cebrian- Perez JA, Muino-Blanco T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 226-33.
25. Pontbriand D, Howard JG, Schieve MC, Stuart LD, Wildt DE. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 1989; 26: 341-54.
26. Salamon S, Maxwell WM. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 1995; 38: 1-36.
27. Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 18: 77-111.
28. Saleh AI. Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates, *Anim Reprod Sci* 1997; 49: 161-7.
29. Soylu MK. Koç spermasının 5°C'de saklanması boğa seminal plazmasının etkisi. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 1997; 3(2): 21-6.
30. Soylu MK, Nur Z, Ustuner B, Dogan I, Sagirkaya H, Gunay U, Ak K. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thaw ram semen. *Bull Vet Inst Pulawy* 2007; 51: 241-6.
31. Stanic P, Tandara M, Sonicki Z, Simunic V, Radakovic B, Suchanek E. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 91: 65-70.
32. Varisli O, Uguz C, Agca C, Agca Y. Motility and acrosome integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Anim Reprod Sci* 2008; 110: 256-68.

Yazışma Adresi:

Arş. Gör. Selim ALÇAY
 Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 Dölerme ve Suni Tohumlama ABD,
 Görükle/BURSA
 Tel: (0224) 294 13 56-0555 993 09 72
 Faks: (+90 224) 294 12 02
 E-posta: salcay@uludag.edu.tr