

**T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI**

118811

**FARKLI ORANLARDA GLİSEROL İLAVE EDİLEN
SULANDIRICILARLA SULANDIRILAN KOÇ SPERMASININ
SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE DONDURULABİLİRLİĞİ
ÜZERİNE ASKORBİK ASİT (VİTAMİN C)'İN ETKİSİ**

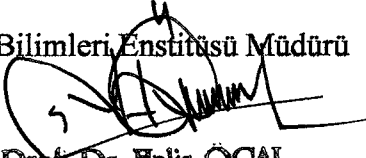
118811

DOKTORA TEZİ

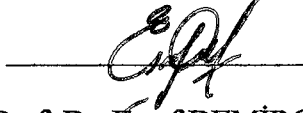
**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**MUSTAFA SÖNMEZ
ELAZIĞ – 2002**

ONAY SAYFASI

Fırat Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Halis ÖCAL

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Eşref DEMİRCİ

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Eşref DEMİRCİ

Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

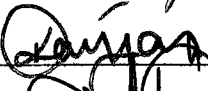
Prof. Dr. Eşref DEMİRCİ

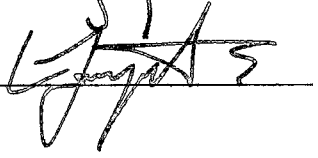
Prof. Dr. Kenan ÇOYAN

Prof. Dr. Halis ÖCAL

Yrd. Doç. Dr. Seyfettin GÜR

Yrd. Doç. Dr. Tanzer BOZKURT

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Eşref DEMİRCİ başta olmak üzere çalışmamda büyük yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Gaffari TÜRK'e ve Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr. Tanzer BOZKURT ve Yrd. Doç. Dr. Seyfettin GÜR'e şükranlarımı sunarım.

Ayrıca doktora tez çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya, Mikrobiyoloji ve İç Hastalıkları Anabilim Dallarında Öğretim Elemanlarına, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Halis ÖCAL'a, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği idari personel ve çalışanlarına ve bu çalışmayı 420 nolu proje ile destekleyen FÜBAP çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1.	ÖZET	1
2.	ABSTRACT	3
3.	GİRİŞ	5
3.1.	Koç Spermasını Saklamanın Tarihçesi	6
3.2.	Koçlardan Sperma Alma ve Spermatolojik Özellikler	8
3.3.	Spermanın Dondurulup Çözdürülmesi Sonrası Motilite ve Akrozom Bütünlüğünü Etkileyen Faktörler	10
3.3.1.	Sperma Sulandırıcıları	10
3.3.2.	Sulandırma Oranı	11
3.3.3.	Yumurta Sarısı	12
3.3.4.	Şekerler	13
3.3.5.	Gliserol	13
3.3.6.	Equilibrasyon Süresi	15
3.3.7.	Dondurma Yöntemi	16
3.3.8.	Çözdürme Yöntemi	17
3.4.	Spermanın Kalitesi ve Saklanması Üzerine Vitamin C'nin Etkisi	18
4.	GEREÇ VE YÖNTEM	22
4.1.	Gereç	22
4.2.	Yöntem	22
4.2.1.	Koçlara Kas İçi Enjekte Edilen Vitamin C'nin Spermatolojik Özelliklere Etkisinin Belirlenmesi	22
4.2.1.1.	Spermanın Alınması	22
4.2.1.2.	Spermanın Muayenesi	23
4.2.1.2.1.	Hacmi	23
4.2.1.2.2.	Kitle Hareketi	23
4.2.1.2.3.	Motilite	23
4.2.1.2.4.	Yoğunluk	23
4.2.1.2.5.	Morfolojik Muayene	24
4.2.1.2.6.	Ölü-Canlı Muayenesi	25
4.2.1.2.7.	pH Değerinin Ölçümü	25
4.2.1.3.	Sperma ve Kanda Vitamin C Düzeylerinin Belirlenmesi	26
4.2.1.3.1.	Renk Ayracının Hazırlanması	26

III

4.2.1.3.2.	Standart Solüsyonların Hazırlanması	26
4.2.1.3.3.	Kan Serumlarının Hazırlanması	27
4.2.1.3.4.	Spermaların Hazırlanması	27
4.2.1.3.5.	Standart Kontrolü	27
4.2.1.3.6.	Kan Serum ve Sperma Vitamin C Düzeylerin Ölçülmesi	27
4.2.2.	Benzer Yöntemlerle Alınarak Pooling Yapılan Koç Spermasına Farklı Oranlarda Katılan Gliserol ve Vitamin C'nin Dondurmadan Önce ve Çözdürdükten Sonraki Spermatolojik Özelliklere Etkisinin Belirlenmesi	28
4.2.2.1.	Sulandırıcıların Hazırlanması	28
4.2.2.2.	Ön Sulandırıcının Hazırlanması	29
4.2.2.3.	Ön Sulandırma İşlemi	29
4.2.2.4.	Spermanın Soğutulması	29
4.2.2.5.	Spermaya Katılan Vitamin C'nin Toksisitesinin Belirlenmesi	29
4.2.2.6.	Farklı Oranlarda Gliserol ve Değişik Miktarlarda Vitamin C İlave Edilen Sulandırıcıların Hazırlanması	29
4.2.2.7.	Gliserolasyon	30
4.2.2.8.	Equilibrasyon	30
4.2.2.9.	Spermanın Dondurulması	30
4.2.2.10.	Dondurulmuş Spermanın Çözdürülmesi	31
4.2.3.	İstatistiki Analiz	31
5.	BULGULAR	32
5.1.	Standart Kontrolü	32
5.2.	Vitamin C Enjeksiyonlarından Önce ve Sonra Elde Edilen Kan serumu ve Spermalardaki Vitamin C Düzeyleri	33
5.3.	Koçlara Kas İçi Enjekte Edilen Vitamin C'nin Spermatolojik Özelliklere Etkisi	34
5.4.	Spermaya Katılan Vitamin C'nin Toksisitesi	38
5.5.	Farklı Oranlarda Gliserol İçeren Koç Spermasına Değişik Miktarlarda İlave Edilen Vitamin C'nin Dondurma Öncesi ve Sonrasında Spermatolojik Özelliklere Etkisi	40
5.5.1.	Ön Sulandırılması Yapılmış Pooling'e Ait Spermatolojik Özellikler ..	40
5.5.2.	Gliserolasyon ve Equilibrasyon Sonucu Elde Edilen Spermatolojik Özellikler	40

IV

5.5.3.	Dondurulup Çözdürülmüş Spermallerdeki Spermatolojik Özellikler ..	42
6.	TARTIŞMA	45
7.	KAYNAKLAR	66
8.	ÖZGEÇMİŞ	75



TABLO LİSTESİ

1. Standart Kontrolü (Değişik Miktarda Vitamin C İçeren Solüsyonların Spektrofotometrik Ölçüm Değerleri)	32
2. Vitamin C Enjeksiyonundan Önce ve Sonra Koçların Kan Serum ve Spermasındaki Vitamin C Düzeyleri	33
3.1. Koçlara Vitamin C Enjeksiyonları Yapılmadan Önce ve Sonraki Spermatolojik Özellikler	35
3.2. Koçlara Vitamin C Enjeksiyonları Yapılmadan Önce Ve Sonraki Spermatolojik Özellikler	36
4. Sıcaklığı 4°C Olan Spermaya Değişik Miktarlarda İlave Edilen Vitamin C'nin Spermatolojik Özelliklere Etkisi	39
5. Pooling Yapılan 6 Koç Spermasının 37°C'de Sulandırılmasından ve 4°C'ye Kadar Soğutulduktan Sonraki Spermatolojik Özellikler	40
6. Farklı Oranlarda Gliserol ve Vitamin C İçeren Sulandırıcılarla Sulandırılmış Spermaların, Gliserolasyon ve Equilibrazyondan Sonraki Spermatolojik Özellikleri	41
7. Farklı Oranlarda Gliserol Ve Vitamin C İçeren Sulandırıcılarla Sulandırılmış Spermaların Dondurulup Çözdürülmesi Sonucu Tespit Edilen Spermatolojik Özellikler	43

ŒEKİL LİSTESİ

1. Standart Kontrolün Spektrofotometrik Ölçümlerinin Grafiksel Dağılımı 32



ÖZET

Bu çalışma, koçlara intramusküler uygulanan vitamin C'nin, spermatolojik özellikler üzerine etkisi ile değişik oranlarda gliserol ve vitamin C ilave edilen sulandırıcılarla koç spermasının sulandırılmasının spermanın dondurulabilirliği ve spermatolojik özellikler üzerine etkisi araştırılmak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada 6 Akkaraman koç kullanıldı. Koçlardan bir ay süreyle, 3 günde bir, kan ve elektroejakülatörle sperma alındı. Sonra koçlara 30 gün süreyle 20 mg/kg/gün i.m. vitamin C uygulandı. Bu süre esnasında da benzer şekilde kan ve sperma alındı. Kan ve spermalarındaki vitamin C düzeyleri ile spermaların spermatolojik özellikleri tespit edildi.

Araştırmanın ikinci kısmında aynı koçlardan alınan spermalar pooling yapılarak ön sulandırılması yapıldı ve sıcaklığı 2 saat içerisinde 4°C'ye düşürülerek 20 eşit kısma ayrıldı. Spermalar, farklı oranlarda gliserol (%0,1,3,5,7) ve vitamin C (0,0.5,1,2 mg/ml) içeren 20 farklı sulandırıcıyla 1:1 oranında sulandırıldı. Sulandırılmış spermalar 0.25'lik payetlerde 4 saat bekletildikten sonra sıvı azot buharında donduruldu. Dondurulan spermalar, 38°C'de 25 saniyede çözündürülerek spermatolojik özellikleri belirlendi.

Vitamin C enjeksiyonlarından sonra, koçların kan serumu ve sperma vitamin C düzeylerinin yükseldiği ($P<0.01$), sperma miktarı ve spermatozoon yoğunluğunun arttığı ($P<0.05$), motilite ve diğer spermatolojik özelliklerin ise değişmediği ($P>0.05$) tespit edildi.

Farklı oranlarda gliserol ve vitamin C ilave edilen gruplarda, vitamin C miktarının artışına bağlı olarak spermatolojik özelliklerde herhangi bir farklılık görülmedi. Gliserolasyon ve equilibrasyondan sonra, gliserol oranının artışına bağlı olarak akrozoma bağlı anormal spermatozoon, toplam anormal spermatozoon ve ölü spermatozoon oranları yükselirken ($P<0.05$), spermatozoon motilitesinin düştüğü ($P<0.05$) görüldü. Spermanın dondurulup çözündürülmesi sonucu gliserol oranının artışına bağlı olarak akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı, toplam anormal spermatozoon oranı ve spermatozoon motilitesi yükselirken ($P<0.05$) ölü spermatozoon oranı azaldı ($P<0.05$).

Sonuç olarak koçlara i.m. Vitamin C uygulanması spermanın miktar ve yoğunluğunu önemli derecede artırdığından, aşım mevsiminde yapılacak uygulamaların sperma kalitesini olumlu yönde etkileyeceği söylenebilir.

Koç spermalarında gliserolasyon ve equilibasyon sonucu, gliserol oranının artışı (%0-%7) spermatolojik özellikleri olumsuz yönde etkilemesine rağmen dondurup çözdüme sonucu en iyi sonuçlar %5 gliserol katılan gruptan elde edilmiştir. Dondurup çözdüme sonucu vitamin C'nin spermatolojik özellikler üzerine önemli bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Koç, Sperma, Dondurma, Vitamin C, Gliserol



ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of intramuscular administration of ascorbic acid on spermatological characteristics in rams, and influence of semen diluted by extenders containing different proportions of glycerol and vitamin C on semen freezability and spermatological parameters.

In this investigation, six Akkaraman rams were used. Semen was collected by electroejaculator once every three days during one month. Blood samples were taken after semen collections. After the intramuscular administration of vitamin C at a dose of 20 mg/kg/day during 30 days, blood and semen samples were taken similarly once in three days during injections. All ejaculates were evaluated for spermatological characteristics. Vitamin C levels were determined in blood serum and semen samples.

In the second part of the experiment, semen collected from the same rams were pooled in a glass tube. Pooled semen were diluted in 1:4 (v/v, semen:extender). It was cooled slowly to 4°C within 2 h. Each of the resulting diluted and cooled 20 semen groups was diluted 1:1 with one extender group containing different proportions of glycerol (0,1,3,5,7%) and ascorbic acid (0,0.5,1,2 mg/ml). Extended semen was packaged in 0.25 ml French straws. The semen was allowed to equilibrate for 4 h before freezing. The straws were frozen in liquid nitrogen vapour. The straws from each treatment were thawed in a water bath at 38°C for 25 s.

After administration of vitamin C, significant increases were observed in the average vitamin C levels in blood serum and semen of rams ($P<0.01$), the average semen volume and sperm concentration ($P<0.05$), but the changes in the average sperm motility and other spermatological characteristics were not significant ($P>0.05$).

There was no significant difference in spermatological characteristics depending on the increase in proportions of vitamin C after glycerolation, equilibration, freezing and thawing.

After glycerolation and equilibration, though the increase in the glycerol levels reduced motility ($P<0.05$), it raised the rate of dead sperm, the rate of acrosomal damaged spermatozoa, and the total rate of abnormal spermatozoa ($P<0.05$). After freezing and thawing, while the increase in the level of glycerol raised motility, the rate of acrosomal damaged spermatozoa and total rate of abnormal spermatozoa ($P<0.05$), it reduced the rate of dead sperm ($P<0.05$).

In conclusion, intramuscular administration of vitamin C in rams increased semen volume and spermatozoon concentration. Therefore, intramuscular administration of vitamin C in rams can improve semen quality in breeding season.

Although the increase in glycerol levels (0%-7%) in diluted semen had negative effects on spermatological characteristics after glycerolation and equilibration, the best results were observed in diluted semen groups containing 5% glycerol after freezing and thawing. However the increase in the proportions of vitamin C in extended semen did not change the spermatological characteristics.

Keywords : Ram, Semen, Freezing, Vitamin C, Glycerol



3. GİRİŞ

Ülkemiz yaklaşık 29 milyon 435 bin koyun varlığı (11) ile önemli bir koyun popülasyonuna sahip olup iklim ve tabiat şartları yönünden koyunculuğa elverişli bir yapı göstermektedir. Ülkemizdeki hayvancılık sektörü içerisinde et, süt ve yapağı üretimi bakımından koyunculuk önemli bir yere sahiptir. Ancak ıslah çalışmalarındaki yetersizlikler, dölverimi düşüklüğü, bakım ve besleme şartlarının yetersiz olması ve erken kuzu kesimi gibi nedenlerden dolayı koyunculukta yeterli gelişme sağlanamamıştır. Dünya standartlarında bir yetiştiriciliğin yapılabilmesi için bakım ve beslenme özellikle de mera şartlarının iyileştirilmesi ve daha da önemlisi genotipik yapının ıslah edilerek üstün özelliklere sahip generasyonların elde edilmesi gerekmektedir.

Koyunlarda genotipik yapının iyileştirilmesi amacıyla ülkemizde saf yetiştirme ve melezleme çalışmaları yapılmaktadır. Melezleme yöntemi, yerli koyun ırklarının yüksek verimli kültür ırklarına dönüştürülmesini sağlayan güvenilir yöntemlerden biridir. Melezleme çalışmalarında, tabii tohumlamaya nispetle suni tohumlama yöntemi kullanılarak üstün genotipik yapı ve verim özelliklerine sahip koç spermalarıyla kısa sürede daha fazla sayıda koyunun tohumlanması mümkündür. Bu nedenle ekonomik verim özellikleri düşük olan yerli koyun ırklarında verimin yükseltilmesi ancak suni tohumlama uygulamalarıyla gerçekleştirilebilir. Diğer taraftan, ülkemizdeki yerli koyun ırklarının çoğunun büyük ve aşırı yağlı kuyruk yapısına sahip olması nedeniyle ıslah çalışmalarında kullanılan koçların söz konusu kuyruğu çevirerek bu koyunlara aşım yapamaması, melezleme çalışmalarında suni tohumlama uygulamalarını zorunlu hale getirmektedir (5).

Ülkemizde saha şartlarında yapılan suni tohumlama çalışmalarında genellikle sulandırılmış taze sperma kullanılmaktadır. Ancak taze spermanın fertilitésinin 1-2 günle sınırlı olması ve bölgesel olarak taşıma zorluklarının bulunması, araştırmacıları spermanın dondurularak kullanılmasına yönlendirmiştir (18).

Dondurulmuş koç sperması, boğa spermasının suni tohumlamada kullanıldığı kadar başarılı bir şekilde kullanılamamaktadır. Bunun başlıca nedenlerinden birisi koç spermasının dondurulup çözülmesi sonucu elde edilen motilitenin memnuniyet verici olmamasıdır (142, 145).

3.1. Koç Spermasını Saklamanın Tarihçesi

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde spermanın uygun koşullar altında başarılı bir şekilde saklanması suni tohumlamanın ilk uygulanmaya başlanmasından bu yana önemli bir uğraşı alanı oluşturmıştır. İlk uygulamalarda sperma alındıktan hemen sonra dişi genital kanala verildiğinden böyle bir sorun gündeme gelmemiş ise de suni tohumlama uygulamalarının yaygınlaşmaya başlamasıyla önemli damızlık koçların spermalarının farklı bölgelere taşınarak daha fazla sayıda koyun tohumlanmasının amaçlanması, spermanın suni koşullar altında uzun süre saklanması ihtiyacını doğurmuştur. Bu da ancak spermatozoa metabolizmasının yavaşlatılması ya da durdurulması suretiyle fertil hayatın uzaması sağlanarak başarılabilirdi. Bu amaçla bazı araştırmacılar (91, 111) spermanın sıcaklığının düşürülerek spermatozoon metabolizmasının yavaşlatılması veya durdurulması suretiyle spermanın sıvı olarak saklanması veya 0°C'nin altında dondurularak saklanması konularında geniş çaplı araştırmalar yapmıştır.

Bilimsel olarak spermanın dondurulması konusunda yapılan ilk çalışmalar İtalyan fizyolog Lazzaro Spallanzani (131)'ye aittir. Bu bilgin, 1776 yılında köpek, aygır ve insan spermasının kar içerisinde sakladığında spermatozoonların ölmediğini ancak motilitenin geçici olarak kaybolduğunu, bu spermaların sıcaklığının tekrar yükseltilmesi durumunda ise hareketlerin yeniden başlayarak spermatozoonların normal duruma geldiklerini bildirmiştir.

Yamane ve Kato (147), 1928 yılında yaptıkları çalışmada aygır spermatozoonlarının glikoz (%5)-fosfat sulandırıcısı (pH 7.2-7.4) ile sulandırılması sonucu sulandırılmamış spermalara göre 10 kat daha uzun bir süre yaşadıklarını bildirmişlerdir. Bunun üzerine Milovanov (93), farklı türlerin spermaları için fosfat sulandırıcısını geliştirmiş ve glikoz-fosfat sulandırıcısı ile sulandırarak 7-18°C'de 20-25 saat saklamış olduğu koç spermalarıyla %53 oranında kuzulama oranı elde ettiğini bildirmiştir.

Taze ve sulandırılmış spermalarla yapılan suni tohumlama çalışmaları, 1940'lı yıllarda koyun yetiştiriciliği programlarında geniş ölçüde kullanılmaya başlanmıştır. Daha üstün genotipik özelliklere sahip koçların spermalarıyla mevsimin farklı zamanlarında ve daha fazla sayıda koyunun tohumlanmasının gerekmesi ve spermanın alındığı bölgeden uzak yerlere taşınmasına ihtiyaç duyulması gibi

hususlar uygun koşullar altında koç spermasının saklanması konusundaki araştırmaları teşvik etmiştir (91, 111).

Rus bilim adamı Milavanov (94), sperma sıcaklığının sıfıra yakın derecelere düşürülmesi sonucu ortaya çıkan soğuk şokunun spermatozoonlar üzerinde dönüşü olmayan bazı hasarlara neden olduğunu, ancak spermanın kademeli olarak soğutulması veya spermaya lipid ilave edilmesiyle bu durumun üstesinden gelinebileceğini bildirmiştir.

Değişik kaynaklardan (yumurta sarısı, testis, corpus luteum, beyin, soya fasülyesi) elde edilen lipidlerin soğuk şokuna karşı spermatozoonları koruduğunun anlaşılmasından sonra Phillips ve Lardy (104), boğa spermasının korunması amacıyla yumurta sarısı-fosfat sulandırıcısını geliştirmişlerdir. Daha sonra Salisbury ve ark. (116), yaptıkları araştırmalar sonucunda yumurta sarısı-sitrat sulandırıcısının daha iyi bir sperma sulandırıcısı olduğunu tespit etmişlerdir.

Aynı yıllarda koç spermasını sulandırmak amacıyla yağlı ve yağsız süt sulandırıcıları da kullanılmıştır. Dauzier (38), yaptığı bir çalışmada kaynatılmış soğutulmuş yağsız süt ile 11 kat sulandırılan ve tohumlama öncesi 12 saat süreyle 2-4°C'de saklanan koç spermalarıyla %51 oranında gebelik elde ettiğini bildirmiştir.

Yapılan bütün çalışmalara rağmen 0°C'ye yakın sıcaklıklarda sıvı olarak 24 saatten daha fazla saklanan spermalarla yapılan tohumlamalar sonucu elde edilen dölverimi oranlarında azalmanın görülmesi, araştırmacıları spermanın dondurularak saklanmasına yönlendirmiştir.

Spermanın dondurulmasına ait ilk bilgiler, 1937 yılında memeli ve kanatlı spermasını -21°C'de gliserol solüsyonu (%9.2) kullanarak dondurmaya başaran Bernstein ve Petropavlovsky (20)'ye aittir. Bundan sonra 1949 yılında Polge ve ark. (105)'nin spermanın dondurulması üzerine yaptıkları çalışmalar neticesinde, gliserolün soğuğa karşı koruyucu etkisinin olduğu herkesçe kabul edilmiştir. Bu önemli keşfi, 1950 yılında Emmens ve Blackshaw (47)'in boğa, koç ve tavşan spermalarını gliserol içeren koruyucu medyumlar içerisinde ve düşük sıcaklıklarda dondurup saklamaları izlemiştir. Bu çalışmalarda dondurulmuş boğa spermalarıyla memnuniyet verici sonuçlar alınırken, dondurulmuş koç spermalarıyla yapılan tohumlamalarda fertilite oranlarının düşük olduğu görülmüştür.

1970'li yılların ortalarında ise çalışmalar organik sulandırıcıların kullanılması üzerinde yoğunlaşmıştır. Visser ve Salamon (143) tarafından 1973 yılında spermanın

saklanması amacıyla Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) içeren sulandırıcılar bulunmuştur. Temelde bu sulandırıcılar, pH değişimlerine karşı fosfat ve sitrat sulandırıcılarına göre daha toleranslı ve esnektirler. Günümüzde Tris sulandırıcısı koç spermasının uzun süreli saklanması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (111).

Özellikle 1975 yılından itibaren koç spermasının dondurulması ile ilgili değişik sulandırıcılar ve maddeler kullanılarak bir çok çalışma yapılmış, ancak bunların neticesinde dondurulup çözündürülme sonucu elde edilen motilite ve fertilitite oranları henüz istenilen düzeylere ulaşmamıştır (111).

3.2. Koçlardan Sperma Alma ve Spermatolojik Özellikler

Koçlardan sperma hem suni vagenle hem de elektroejakülatörle alınabilir. Elektroejakülatör hayvanın canını acıtabilen, kimi zaman kaslarda kasılma ve felçlere yol açabilen, mecbur kalınmadıkça başvurulmaması gereken bir metottur. Suni vagen yöntemi en kolay, en sağlıklı ve en güvenilir bir yöntemdir. Ancak alıştırılmadığı sürece çoğu koç suni vagenle sperma vermez. Ayrıca sperma alma esnasında kızgın bir koyun ya da koyun benzeri bir makete ihtiyaç vardır. Her iki metot karşılaştırıldığında elektroejakülatörle alınan spermalar, suni vagenle alınanlara göre hacimce daha fazla, yoğunluk olarak da daha düşüktür (41, 62, 123, 124).

Kimi bilim adamları (18, 41, 62, 78)'nın bildirdiklerine göre koçlarda sperma hacmi 0.7-2.0 ml, spermatozoon motilitesi %60-80, spermatozoon yoğunluğu $1.5-5.0 \times 10^9/\text{ml}$, canlı spermatozoon oranı %80-95 ve toplam anormal spermatozoon oranı da %4-15 arasında değişmektedir.

Cameron (28), yaptığı çalışmasında 5 Merinos koçtan elektroejakülatörle aldığı spermalarda ortalama sperma hacmini 0.98 ml, mass aktiviteyi 3.10, motiliteyi %73.6 ve spermatozoon yoğunluğunu $1.330 \times 10^9/\text{ml}$ olarak bulmuştur.

Demirci (42), 3-4 yaşlarındaki 4 İvesi koçundan suni vagenle aldığı spermalarda ortalama sperma miktarını 0.93 ml, spermatozoon yoğunluğunu $3.938 \times 10^9/\text{ml}$, spermatozoon motilitesini %72.6 ve toplam anormal spermatozoon oranını da %5.16 olarak tespit ettiğini bildirmektedir.

Aksoy ve ark. (7), benzer bir araştırmada 6 Konya Merinosu koçundan suni vagenle sperma alarak ortalama sperma miktarını 0.9 ml, spermatozoon motilitesini %76.7, spermatozoon yoğunluğunu $2.680 \times 10^9/\text{ml}$ ve toplam anormal spermatozoon

oranını da %6.17 olarak bulurken, bir başka çalışmalarında (6) ise, 5 Akkaraman koçundan suni vajenle sperma alarak ortalama sperma miktarını 1.01 ml, spermatozoon motilitesini %65.7, spermatozoon yoğunluğunu $3.040 \times 10^9/\text{ml}$, ölü spermatozoon oranını %6.67 ve toplam anormal spermatozoon oranını da %7.19 olarak hesaplamışlardır.

Gündoğan ve Demirci (59), 1.5-2 yaşındaki 9 Akkaraman ırkı koçtan suni vajenle aldıkları spermalarda, ortalama sperma miktarını 0.81 ml, kitle hareketini 4.36, spermatozoon motilitesini %79.9, spermatozoon yoğunluğunu $3.620 \times 10^9/\text{ml}$, anormal spermatozoon oranını %3.63 ve pH değerini de 6.59 olarak bulduklarını bildirirlerken, Gülyüz ve Yıldız (58), iki Akkaraman ırkı koçtan suni vajenle aldıkları spermalarda, ortalama sperma miktarını 1.3 ml, spermatozoon motilitesini %90, spermatozoon yoğunluğunu $3.300 \times 10^9/\text{ml}$, toplam anormal spermatozoon oranını %5.75 ve sperma pH değerini de 6.95 olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Öztürkler ve ark. (100), 6 Kıvırcık koçtan elektroejakülatörle aldıkları spermalarda, ortalama sperma hacmini 0.8 ml, mass aktiviteyi 4.5, spermatozoon motilitesini %80.3, spermatozoon yoğunluğunu $2.400 \times 10^9/\text{ml}$, ölü spermatozoon oranını %22.5, akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranını %5.8 ve toplam anormal spermatozoon oranını da %14.4 olarak bulmuşlardır.

Tümen ve Özkoca (140), 5 Merinos ırkı koçtan suni vajenle sperma aldıkları araştırmada spermatozoon motilitesinin %80, ölü spermatozoon oranını %17.4, akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranının %2.1 ve toplam anormal spermatozoon oranının da %4.2 olduğunu bildirmişlerdir.

Gökçen ve ark (56), 8 Merinos ırkı koçtan suni vajenle sperma alarak ortalama sperma hacmini 1.0 ml, mass aktiviteyi 3.5, spermatozoon motilitesini %72.3, spermatozoon yoğunluğunu $3.100 \times 10^9/\text{ml}$, ölü spermatozoon oranını %8.4, anormal spermatozoon oranını %7.18 ve sperma pH değerini de 6.8 olarak bulmuşlardır.

Tekin ve Günzel (136), üç Alman etçi Merinos koçundan suni vajenle aldıkları spermarda, ortalama spermatozoon motilitesini %82.3 ve akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranını da %4.7 olarak tespit etmişlerdir.

Sinha ve Sahni (127), Merinos ırkı koçlarda suni vajenle sperma alarak yaptığı araştırmada 1.5-2.5 yaşlarındaki koçların sperma hacminin ortalama 0.71 ml, spermatozoon yoğunluğunun $2.700 \times 10^9/\text{ml}$ olduğunu, 4-5 yaşlarındaki koçlarda ise

bu değerlerin sırasıyla 0.83 ml ve 3.400×10^9 /ml olduğunu tespit etmiş ve yaşa bağlı olarak spermatolojik özelliklerin değiştiğini bildirmiştir.

Cochran ve ark (30), elektroejakülatör yöntemiyle sperma almak suretiyle 5 ayrı ırk koç üzerinde yaptıkları çalışmada spermatolojik özellikler açısından ırka bağlı değişimlerin önemli derecede farklılık gösterdiğini ileri sürmektedirler.

Saleh (115), yaptığı çalışmada spermatolojik özelliklerin mevsimlere bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterdiğini bildirirken, benzer bir çalışmada Daader ve ark. (34), iklim şartlarının spermatolojik özellikleri etkilediğini belirtmişlerdir.

Elwisby ve ark. (46), yaptıkları çalışmada koçlarda spermatozoon yoğunluğunun yılın diğer mevsimlerine göre yazın daha yüksek olduğunu, buna karşılık sonbaharda ise cinsel istek ve sperma hacminin en yüksek seviyelere ulaştığını ve mevsimlerin spermatolojik özellikleri etkilediğini savunmaktadırlar.

Gür ve Tatlı (60), aynı yaştaki 10 Akkaraman koçu iki gruba ayırarak farklı şekilde besleme uyguladıkları araştırmalarında, değişik rasyonlarla beslemenin koçlarda spermatolojik özellikleri etkilediğini bildirmişlerdir. Yine benzer şekilde Kramer ve ark. (82) ile Gökçen ve ark. (56)'da yaptıkları çalışmada koçların beslendiği rasyonun testis gelişimini ve spermatolojik özellikleri etkilediğini bildirmektedirler.

3.3. Spermanın Dondurulup Çözdürülmesi Sonrası Motilite ve Akrozom Bütünlüğünü Etkileyen Faktörler

Spermanın dondurulup çözdürülmesi sonucu elde edilen spermatozoon motilitesi ve akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı; sperma sulandırıcılarının içeriği, gliserol oranı, equilibasyon süresi, dondurma ve çözündürme yöntemleri gibi bir çok faktör tarafından etkilenmektedir (45, 55, 106, 128).

3.3.1. Sperma Sulandırıcıları

Spermanın düşük sıcaklıklarda saklanması esnasında soğuk şokunun zararlı etkilerinin soğutma işleminden önce spermaya lesitin ve lipoproteinlerin ilave edilmesi ve spermanın kademeli olarak sıcaklığının düşürülmesi suretiyle önleildiğinin anlaşılmasından sonra günümüzde de işlevini sürdüren bir çok sulandırıcı geliştirilmiştir.

Glikoz-sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı koç spermasının sulandırılmasında genel olarak kabul görmüş bir sulandırıcıdır. Bu sulandırıcı genellikle koç spermasının kısa süreli saklanması başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak bu

sulandırıcı ile sulandırılarak dondurulan koç spermalarından elde edilen fertilité sonuçlarının düşük olması (%17-40) nedeniyle dondurma çalışmalarında pek kullanılmamaktadır (76, 113, 121).

Yağsız süt sulandırıcısı, koç spermasının sulandırılmasında yıllarca kullanılmıştır. Bu sulandırıcının başarısı pH'daki değişikliklere karşı bir tamponlayıcı olarak rol oynayan protein içeriğinden kaynaklanmaktadır (75). Süt özellikle spermanın kısa süreli saklanması amacıyla kullanılmakta olup süt sulandırıcısı ile dondurulan koç spermasından elde edilen fertilité oranları farklı olmakla beraber (% 0-45) memnuniyet verici görülmemektedir (113, 137).

Sperma sulandırıcılarının geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, organik maddelerin denenmeye başlanmasından sonra araştırmacılar Tris (hydroxymethyl)-aminomethan sulandırıcısını geliştirmişlerdir (143). Yapılan bazı araştırmalar (92, 114), tris sulandırıcısının, sitrat ve fosfat sulandırıcılarına göre tamponlama kapasitesinin daha iyi olduğunu ve yaşayan hücreler üzerine daha az toksik etkisinin bulunduğunu ortaya koymuştur. Tris'in spermatozoon içerisine girebilmesi ve pH değişimlerine karşı hücreler arası tampon olarak rol oynaması, spermanın saklanmasıda önem arz eden sulandırıcı esnekliğini daha da yükseltmiştir. Bu özelliklerinden dolayı tris sulandırıcısı boğa ve koç spermasının saklanması amacıyla kullanılmış ve trisin 10-50 mM arasında değişen konsantrasyonlarının spermatozoon motilitesini ve metabolizmasını olumsuz yönde etkilemediğini, hatta spermatozoonların 250-400 mM arasındaki tris konsantrasyonlarına dahi tolerans gösterebildiği bildirilmiştir (111, 143).

Tris-glikoz-yumurta sarısı temeline dayalı sperma sulandırıcılarının koç spermasının dondurularak saklanması için uygun olduğu ve yaygın bir şekilde çalışmalarda kullanıldığı belirtilmektedir (48, 111).

3.3.2. Sulandırma Oranı

Koç spermasının sulandırılma oranı ile ilgili olarak değişik görüşler öne sürülse de tohumlama yöntemlerine bağlı olarak yüksek yoğunluk ve düşük sulandırma oranları daha çok kullanılmaktadır. Uygun sulandırma oranları üzerinde araştırmalar yapan Pontbriand ve ark. (106), dondurma işlemi öncesinde koç spermasına ilave edilecek sulandırıcı oranının çözündürme sonucu motiliteyi etkilediğini ve en iyi sonuçların spermanın 1:4 ile 1:6 arasında sulandırılmasıyla elde edildiğini ileri sürmektedirler.

Al-Hanak ve Spasova (8) ise, yaptıkları çalışmada sulandırma oranının çözdürme sonucu motiliteyi etkilemediğini ancak koç sperması için en uygun sulandırma oranlarının 1:3 ve 1:5 olduğunu savunmaktadırlar.

3.3.3. Yumurta Sarısı

Koç spermasının soğutulması esnasında sıcaklığının hızlı bir şekilde 37°C'den 0°C'ye yakın sıcaklıklara düşürülmesiyle oluşan soğuk şoku, motilitenin dönüşümsüz bir şekilde azalmasına ve hücre içi enzimlerin hücre dışına sızmasına yol açar. Oluşan soğuk şokunun zararlı etkilerine karşı spermatozoonları korumasından dolayı yumurta sarısı yaygın olarak sperma sulandırıcılarına ilave edilmektedir. Yumurta sarısının soğuğa karşı koruyucu etkisi, düşük yoğunluktaki lipoproteinleri içermesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, yumurta sarısının bu koruyucu etkisi sadece soğutma esnasında değil aynı zamanda dondurma esnasında da devam etmektedir (40, 50, 146). Öte yandan, yumurta sarısının koç spermatozoonlarındaki lipid peroksidasyon oranını da belli ölçülerde azalttığı bildirilmektedir (74).

Abdelhakeam ve ark. (2), sulandırıcıya yumurta sarısı ilave edilmesinin, özellikle spermanın 5°C'ye kadar hızlı bir şekilde soğutulmasından sonra elde edilen motilite oranı üzerine pozitif etki yaptığını bildirmektedirler.

Koç spermasının dondurulması için hazırlanan sulandırıcıya ilave edilecek yumurta sarısı oranı ile ilgili değişik görüşler öne sürülmüştür. Salamon ve Maxwell (111)'in bildirdiğine göre, yapılan ilk çalışmalarda yumurta sarısının sperma sulandırıcılarına %30-50 oranında katılması gerektiği belirtilirken sonraki çalışmalarda bu oranın %3-6 oranlarında olmasının yeterli olacağı savunulmuştur. Bunun aksine Graham ve ark. (57), sulandırıcıdaki yumurta sarısı oranının %2-4 gibi düşük konsantrasyonlarda olmasının yeterli koruma sağlayamadığını ileri sürmektedirler. Sanchez-Partida ve ark. (117) ise, yumurta sarısının %5, 10, 15, 20 oranlarında sperma sulandırıcılarına katılmasının spermanın çözdürülmesi sonucu elde edilen spermatozoon motilitesini etkilemediğini bildirmişlerdir.

Watson ve Martin (144), sperma sulandırıcısına ilave edilen yumurta sarısı oranındaki artışın gliserolün yüksek konsantrasyonlarına olan gereksinimi azalttığını ileri sürmüştür.

Yumurta sarısı yerine benzer aktiviteye sahip bazı maddeler geliştirilse de yumurta sarısının spermatozoonların plazma membranı üzerindeki koruyucu

etkisinden dolayı, özellikle koç spermasını dondurmak amacıyla kullanılan sulandırıcılardaki önemi hala güncelliğini sürdürmektedir (111).

Dondurma yöntemine ve sulandırıcıdaki diğer maddelerin oranlarına bağlı olarak değişmekle birlikte, Tris sulandırıcısına %15 oranında yumurta sarısı katılmasının uygun olacağı bildirilmiştir (112).

3.3.4. Şekerler

Şekerlerin ekstrasellüler sıvıda bulunması osmotik basıncın ve spermatozoon membran bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynar. Başlangıçta şekerler, sperma sulandırıcılarına spermatozoonlar için hazır metabolize edilebilir maddeler olarak düşük oranlarda katılmasına rağmen sulandırıcıdaki şeker oranının yükseltilmesinin spermanın dondurulup çözündürülmesi sonucu spermatozoon motilitesini artırdığının belirlenmesi şekerlerin önemini artırmıştır (2, 85, 96).

Şekerler, spermanın dondurulup çözündürülmesi sırasında oluşabilecek zararlara karşı spermatozoon membranını koruyabilirler. Bu etki direk olarak membranla ilişkili olup spermatozoon membranındaki fosfat grupları ile şekerlerdeki hidroksil gruplarının bağlanmasından ileri gelmektedir (40).

Koç spermasında sadece fruktoz bulunmasına rağmen sulandırıcılara glikoz ve mannoz ilave edildiğinde spermatozoonlar bu şekerleri metabolize edebilir. Bunun dışındaki şekerler enerji kaynağı olarak kullanılmazlar (91).

Şekerlerin, molekül ağırlıkları, kullanılan dondurma yöntemi ve hızı ile sulandırıcıda diğer soğuğa karşı koruyucu ajanların bulunması gibi faktörlerin etkisi altında spermatozoonların soğuğa karşı korunma düzeyini artırdığı ve şekerlerin molekül ağırlıklarının artırılması ile spermatozoonların daha fazla hayatta kalmasının sağlandığı bildirilmektedir (2).

Sulandırıcı içeriği ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda (114, 143) fruktoz, laktoz ve rafinoz gibi şekerlere kıyasla glikozun tris sulandırıcısı için daha uygun bir şeker olduğu tespit edilmiştir.

Molinia ve ark (96), tris sulandırıcısı içerisine 30-210 mM arasında glikoz katılabileceğini ve bunun çözündürme sonrası spermatozoon motilitesini artırdığını bildirmektedirler.

3.3.5. Gliserol

Gliserolün soğuğa karşı koruyucu bir madde olarak hücrelerin dondurulması esnasındaki faydalı etkilerinin farkına varılmasından sonra, bu madde spermanın

dondurulması amacıyla sulandırıcılara ilave edilerek başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Gliserolün hücre içerisine girmek suretiyle hücre içerisindeki suyun kısmen dışarı çıkmasını sağlayarak solüsyonun donma noktasını düşürdüğü ve dondurma işlemi sırasında geniş buz kristallerinin şekillenmesine engel olduğu bildirilmektedir (18, 40, 62). Ancak spermatozoon membranının, gliserolün su çekiciliğinden dolayı hücre içi ve hücre dışında oluşan osmotik basınç farklılıklarına karşı dayanıklılığının düşük olması nedeniyle membran permeabilitesi bozulmakta ve çeşitli zararlar oluşmaktadır (2, 98, 120, 145). Bununla birlikte Fiser ve Fairfull (51), koç spermatozoonlarının akrozom bütünlüğünün ve motilitesinin, çözündürme sonrasında gliserole bağlı olarak oluşan osmotik değişikliklerden etkilenmediğini, gliserol ilave edilmesiyle ortaya çıkan osmotik basınç değişimlerine tahammül edebildiğini bildirmişlerdir.

Gliserol katılmadan yapılan dondurma işlemleri sonucunda spermatozoonların canlı kalma oranı önemli derecede azalmaktadır. Bu amaçla buz kristallerinin şekillenmesinin tamamen önlenmesi için %30'dan daha fazla gliserol gereklidir (40, 63). Ancak spermaya gliserol ilave edilmesinin dondurulup çözündürülmüş spermada olduğu gibi dondurulmamış spermanın da kalitesini bozduğuna, akrozomal bozukluklara neden olduğuna ve akrozom reaksiyonunun başlamasını hızlandırması nedeniyle spermatozoonların fertilizasyon kapasitesini azalttığına dair çeşitli görüşler ileri sürülmektedir (71, 72, 73, 107, 128).

Fiser ve Fairfull (51), koç spermasının dondurulması amacıyla sulandırıcıya %0 ile %16 oranları arasında gliserol ilave ederek bunun çözündürülme sonrası spermatozoon motilitesine etkisini araştırmışlar ve sonuçta en iyi motilitenin %4-6 arasında gliserol katılmasıyla elde edildiğini, %8'in üzerindeki gliserol konsantrasyonlarının ise spermatozoonlar üzerinde toksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

RoyChoudhury ve Bhambhani (109), koç spermasını %3.5 ve %5 oranında gliserol katılmış sulandırıcılar ile sulandırarak pellet şeklinde dondurduklarını ve çözdürdükten sonra yapılan muayenelerde %5 oranında gliserol katılarak dondurulan spermalardaki motilitenin, %3.5 oranında gliserol katılanlara göre önemli derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Colas (31), koç spermasının %2 ve %4 oranında gliserol katılarak dondurulması sonucu yapılan fertilité denemelerinde %4 oranında gliserol içeren

spermalarla %2 oranında gliserol içerenlere göre daha yüksek gebelik oranı elde edildiğini, bu değerlerin sırasıyla %55.7 ve %38.5 olduğunu bildirmiştir.

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar (2, 67, 126, 133), sulandırılmış spermaya ilave edilen gliserol oranının azaltılması ve alternatif maddeler geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu konuda çalışmalar yapan Abdelhakeam ve ark. (2), koç spermasının, gliserol katılmadan sulandırıcı içerisindeki yumurta sarısı ve diğer bileşiklerin oranları artırılarak ve osmotik basıncı ayarlanarak başarılı bir şekilde dondurulabileceğini ve çözündürülme sonrası yeterli motilite ve fertilitite oranlarının elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Ancak gliserolün yerine kullanılan değişik kryoprotektif özellikteki bir çok maddenin gliserol kadar başarılı sonuçlar vermediği kimi araştırmacılar (40, 45) tarafından iddia edilmektedir.

Johnson ve ark (73), koç spermatozoonlarının akrozomal yapı bütünlüğünün korunabilmesi için düşük gliserol oranının ve yüksek tris molaritesinin gerekli olduğunu bildirmektedirler.

Kimi araştırmacılar da (114, 119, 141), sulandırıcı içerisindeki yumurta sarısı oranı, tris konsantrasyonu ve şeker konsantrasyonlarının koç spermasının başarılı bir şekilde dondurulması için gerekli olan gliserol oranını etkilediğini savunmaktadırlar.

3.3.6. Equilibriasyon Süresi

Equilibriasyon süresi, gliserol spermaya ilave edildikten sonra ve dondurma işleminden önce spermatozoon membranının her iki tarafında gliserolün dengeye ulaşması için spermanın +4°C'de bekletilme süresidir. Gliserolün koç spermatozoonu içerisine girişi, boğa spermatozoonlarındaki kadar hızlı bir şekilde gerçekleşmemektedir (18, 62).

Hill ve ark. (65), equilibriasyon süresinin yarım, 1 yada 18 saat olmasının çözündürme sonrası motilite açısından önemli bir fark oluşturmadığını bildirirken, Blackshaw (23), gliserolasyon sonrası sulandırılmış spermanın dondurulma öncesinde 6 saat süreyle equilibriasyona bırakılmasının daha iyi sonuçlar verdiğini savunmaktadır.

Colas (31), sulandırılmış ve gliserol katılmış spermanın equilibriasyon süresini artırmanın çözündürme sonrası spermatozoon motilitesi açısından önem taşımadığını ancak 2.5 saat sonra elde edilen oranların biraz daha iyi sonuçlar verdiğini ileri sürmektedir.

3.3.7. Dondurma Yöntemi

Spermatozoonların biyokimyasal yapısı oldukça karışık ve sabit olmayan bir özellik taşır. Spermatozoon plazma membranının düzenli bir fonksiyon göstermesi açısından membran yapısındaki lipid ve protein bileşikleri arasında sıkı bir ilişki vardır. Spermatozoonların dondurulması, membran lipid katmanının iki tabakası arasındaki fosfolipid dağılımında değişikliğe yol açar. Membranda meydana gelen bu değişiklikler, akrozom reaksiyonunu hızlandırarak akrozomal enzimlerin dışarı sızmasına ve aktivitelerinin azalmasına neden olarak spermatozoonların motilitesini ve fertilizasyon kabiliyetini sınırlandırabilir (139, 142).

Spermanın dondurulup çözündürülmesi esnasında spermatozoon membranında oluşan hasarlar özellikle buz kristallerinin şekillendiği -10°C ile -25°C arasındaki sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Boğa ve aygır spermatozoonlarının dondurma işlemine tahammülü nispeten iyi iken aynı koşullarda koç ve teke spermatozoonlarının fertilizasyon kapasitesinin azaldığı bildirilmektedir (27, 66).

Dondurma işlemleri esnasında uygulanan dondurma hızı, spermanın çözündürülmesi sonucundaki motilite ve akrozom bütünlüğünü etkilemektedir. Spermatozoonların canlı kalma oranı, mitokondrial aktivite ve akrozom bütünlüğü açısından spermanın hızlı bir şekilde dondurulmasının yavaş bir şekilde dondurulmasına göre daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (27). Benzer şekilde Fiser ve Fairfull (50), koç spermasının hızlı bir şekilde dondurulmasının (20°C/dk) yavaş bir şekilde dondurulmasına (2°C/dk) göre çözündürülme sonrası elde edilen spermatozoon motilitesi ve akrozom bütünlüğü yönünden önemli derecede daha iyi sonuç verdiğini bildirilmişlerdir.

Maxwell ve ark (90), spermanın çözündürülmesi sonucu elde edilen spermatozoon motilitesi bakımından, spermanın pellet şeklinde dondurulmasının payet veya minitüpler içerisinde dondurulmasına göre daha iyi sonuçlar verdiğini ileri sürerken, diğer bazı araştırmacılar da (31, 106) payetlerde dondurulmuş koç spermalarından pellet şeklinde dondurulanlara göre çözündürülme sonucu daha yüksek motilite ve fertilite oranları elde edildiğini bildirmektedirler.

Koç spermasının payetler içerisinde dondurulması daha kolay ve pratik olduğu için günümüzde yaygın olarak kullanılmakta ve tercih edilmektedir (48).

3.3.8. Çözdürme Yöntemi

Dondurulmuş spermaların çözdürülmesi sonucu yeterli motilite ve sağlam akrozom yapısına sahip spermatozoon oranı elde edilmesi bakımından, çözdürme sıcaklığı ve süresi önem taşımaktadır. Çözdürme işlemi, spermanın dondurulması esnasında izlenen aşamaların tekrar geriye dönüşünün sağlanmasıdır. Spermanın çözdürülmesi esnasında uygun şartlar sağlanmadığı takdirde spermatozoonların olumsuz yönde etkilendiği görülmektedir (111).

Koçlarda spermatozoon membranı ince, narin, gevrek ve kolay parçalanabilir olduğundan dondurulup çözdürülme işlemleri esnasında boğa spermatozoon membranına göre daha fazla hasar oluşmaktadır. Ayrıca spermanın sulandırılması, gliserolasyon ve equilibrasyon işlemleri sırasında açığa çıkan metabolizma ürünleri ve bazı reaksiyonlar bu hasarı daha da artırmaktadır (32, 62, 63).

Söderquist ve ark. (130), payetler içinde dondurulmuş koç spermalarının 70°C'de 5 sn'de ve 50°C'de 9 sn'de çözdürülmesinin aynı değerleri taşıdığını ve spermanın bu sıcaklıklarda çözdürülmesinin, düşük sıcaklıklara göre daha yüksek spermatozoon motilitesi ve akrozom bütünlüğü sağladığını bildirirlerken, benzer şekilde Fiser ve ark. (52)'da yüksek sıcaklıkların çözdürme hızı açısından daha uygun olduğunu ve dondurulmuş spermaların 60°C'de 8 sn'lik sürede çözdürülmesinin yüksek spermatozoon motilitesi ve sağlam akrozom yapısı bakımından olumlu sonuçlar verdiğini teyit etmektedirler. Ancak spermanın yüksek sıcaklıklarda çözdürülmesinin spermatozoon ölümlerinin yanında canlı kalanlarda da protein dejenerasyonlarına yol açabildiği ileri sürülmektedir (122).

Kaya ve ark. (77), payetlerde dondurulmuş spermaların yüksek sıcaklıklarda çözdürülmesi sonucu daha iyi motilite elde edilmesine rağmen sağlam akrozom yapısına sahip spermatozoon oranının azaldığını, bu yüzden spermaların 35-38°C'deki su banyosunda 25-30 saniyede çözdürülmesinin daha uygun olduğunu bildirmektedirler. Benzer şekilde Correa ve ark. (32)'da dondurulmuş spermanın çözdürülmesi için 37°C'de 30 sn bekletilmesinin uygun olduğunu vurgulamaktadırlar.

Danasouri (36), spermatozoonlarda bulunan ve fertilizasyonda rol oynayan bir çok enzimin spermanın çözdürülmesi sırasında extrasellüler ortama sızabileceğini ve spermanın 37°C'de çözdürmesi sırasında bu sızmanın daha az olabileceğini bildirmektedir.

Pontbriand ve ark. (106) ise, koç spermasının 37°C'de 20 sn ile 60°C'de 8 sn'de çözündürülmeleri arasında spermatozoon motilitesi ve akrozomal yapı bütünlüğü yönünden önemli bir fark bulunmadığını iddia etmektedirler.

Salamon ve Maxwell (113) ise payetler içerisinde dondurulmuş koç spermasının 38-42°C arasındaki sıcaklıklarda 25-30 saniyede çözündürülmesini önermektedirler.

3.4. Spermanın Kalitesi ve Saklanması Üzerine Vitamin C'nin Etkisi

Vitaminlerin çoğu, hem hayvanlar tarafından sentezlenebildiğinden hem de rasyonlarla yeterli miktarda alınması nedeniyle yetersizliklerine bağlı semptomlar genellikle ortaya çıkmamaktadır. Vitamin C'nin organizmada sentezlendiği ve rasyonda bulunmasına gerek duyulmadığı halde hem erkek hem de dişilerde, dölveriminin azaldığı bazı vakalarda ilave dozların faydalı olduğu bildirilmiştir (17, 18).

Vitamin C'nin spermada bulunduğu ve dölverimini bir ölçüde etkilediği, dölverimi düşük bazı boğalara derialtı. yapılan vitamin C enjeksiyonlarıyla bu hayvanların dölverimi düşüklüğünün düzeltildiği ancak vitamin C'nin dölverimini hangi yolla ve nasıl etkilediği hususunda kesin ve yeterli bilginin henüz olmadığı bildirilmektedir (103, 111).

Hayvanların yemlerine katılarak verilen vitamin C'nin rumende parçalanması nedeniyle parenteral yolla verilmesi tercih edilmektedir (79). Black ve Hıdıroğlu (22), koyunlar üzerinde yaptıkları çalışmada intramuskuler vitamin C uygulamalarının intravenöz yolla uygulananlara göre daha etkili olduğunu savunmaktadırlar.

Vitamin C antioksidant bir madde olup, biyolojik moleküllerin oksidasyonunu önleyici ve azaltıcı bir özelliğe sahiptir (35, 125). Sperma değişik konsantrasyonlarda vitamin C içerebilir. Bu oranlar arasındaki farklılık tür, ırk, yetiştirme ve beslenmeye bağlı olarak değişebilir. Bunun yanında ek salgı bezlerinin işlevi ve spermadaki spermatozoon yoğunluğu da bu seviyelerin değişmesinde etkili olmaktadır (69). Spermadaki vitamin C konsantrasyonunun, kan plazmasına göre 8-10 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir (70).

Dvorak ve Podany (44) testis dokusunda vitamin C konsantrasyonunun erkek genital organlarının diğer kısımlarına göre çok yüksek olduğunu bu nedenle özellikle erkek cinsiyet hücrelerinin şekillenmesi, bu hücrelerin fonksiyonel aktivitelerini

sürdürmeleri ve tubuler yapının bütünlüğünün korunması üzerinde vitamin C konsantrasyonunun önemli bir rol oynayabileceğini bildirmiştir.

Geniş antioksidatif etkilere sahip olan vitamin C, spermada serbest radikalleri nötralize ederek spermatozoonları korur (10, 24, 89), süperoksit dismutaz'ın aktivitesini sürdürür (19) ve diğer antioksidatif sistemi düzenler (26). Askorbik asitin antioksidant etkisinin yanında spermatozoonların çeşitli mitokondrial ve hidrolitik enzimlerini aktive ettiği de bildirilmektedir (83).

Vitamin C ve bazı önemli mineral maddelerin (Ca, Mg, Mn, Zn vb.) metabolizmaları arasında sinerjik bir etki vardır. Bu etkileşimin spermatolojik özellikler yönünden faydalı değişikliklere yol açtığı ve bu değişikliklerin vitamin C'nin fertilité ve spermatolojik karakterleri geliştiren bu mineral maddelerin spermada depolanmasını kolaylaştırmasından kaynaklanabileceği bildirilmiş ve spermada vitamin C ve bazı mineral madde seviyesinin düşmesi ile spermanın kalitesinin bozulması arasında açık bir ilişkinin olduğu gözlenmiştir (64).

Spermadaki vitamin C'nin yüksek konsantrasyonları, spermatozoon DNA'sının oksidatif hasara uğramasını engellemek suretiyle spermatozoonların genetik bütünlüğünü sürdürmesinde anahtar bir rol oynar. Seminal plazmada vitamin C'nin yüksek konsantrasyonlarda bulunması congenital bozukluklara ve kalıtsal değişimlere sebep gösterilen DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkan okside olmuş nükleotidlerin üretilmesine neden olan serbest radikallere karşı bir savunma oluşturur. Spermatozoon DNA'sındaki oksidatif zararların spermatozoonun hayatta kalması yada motilitesi ile bir ilişkisi yoktur. Ayrıca vitamin C'nin yüksek konsantrasyonlarda olması spermatogenesis ve seminal kanallardaki inaktif spermatozoonların depolanması sırasında oksidatif DNA zararlarına karşı koruyucu bir rol oynadığı da bildirilmektedir (35, 53, 67).

Erkek ve dişi üreme organlarındaki antiaglutininler motilitenin sınırlanmasına yol açabilen sperm yapışmalarını önlemede rol oynarlar. Seminal plazmadaki bir antiaglutinin proteini aktif karbonhidrat ve sülfat gruplarına sahip olup indirgenmiş formda aktiftir. Vitamin C gibi indirgeyici ajanlar biyolojik olarak antiaglutininleri aktive ederler (88). Seminal plazmada vitamin C düzeyinin artmasının spermatozoon aglutinasyonlarını önlemek suretiyle sperma miktarı, spermatozoon motilitesi, yaşayabilirliği ve morfolojik yapısı üzerine faydalı etkilerinin olduğu hem in vitro hemde in vivo çalışmalarla ispat edilmiştir (39, 87, 88).

Lewis ve ark. (86), vitamin C'nin spermanın önemli antioksidantlarından biri olduğunu ve asthenozoospermik (erkek cisiyet hücresi yönünden yetersiz) kişilerin seminal plazmasındaki vitamin C seviyelerinin normal kişilere göre önemli derecede düşük olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Srivasta ve ark. (132)'da normal ve düşük yoğunluğa sahip insan spermaları üzerinde yaptıkları ölçümlerde vitamin C miktarının normal yoğunluk gösteren spermalarda daha yüksek olduğunu ileri sürmektedirler.

Alınan besinlerdeki vitamin C miktarlarının önemli derecede azalması, spermadaki vitamin C konsantrasyonunun düşmesine, sperma kalitesinin bozulmasına ve ejakülat hacminin azalmasına yol açarken (44), dietle alınan vitamin C'nin seminal plazmadaki vitamin C düzeyini artırdığı ve sperma kalitesini yükselttiği savunulmuştur (35).

Ciereszko ve Dabrowski (29), alabalıklar üzerinde yaptıkları çalışmada, dietle verilen vitamin C'nin direk olarak seminal plazma askorbik asit konsantrasyonunu etkilediğini ve alabalıklarda oluşan vitamin C eksikliğinin üreme sezonu başında spermatozoon konsantrasyonunu ve motilitesini etkilemezken, ilerleyen günlerde spermatozoon konsantrasyonu ve motilitesinde belirgin bir düşmenin görüldüğünü bildirmişlerdir.

Dawson ve ark. (39), sigara içen erkeklerden oluşan bir grubun dietlerine günlük 200 mg askorbik asit ilave edilmesinin sperma kalitesini artırdığını ve sperma kalitesi ile sperma askorbik asit konsantrasyonu ve kan serumu askorbik asit konsantrasyonu arasında önemli derecede bir ilişkinin olduğunu tespit etmişlerdir.

Nicolas (97)'da, askorbik asitten yoksun yemlerle beslenen domuzlarda sperma askorbik asit konsantrasyonunun azaldığını ve buna bağlı olarak sperma kalitesinin bozulduğunu ve ejakülat miktarında bir azalmanın olduğunu bildirmiştir.

Thiele ve ark. (138), seminal plazma vitamin C seviyesinin, reaktif oksijen türleri seviyesi ile negatif yönlü, normal morfolojiye sahip spermatozoon oranı ile pozitif yönlü ilişki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Aurich ve ark. (15), sulandırılmış aygır spermasına vitamin C ilave edilmesinin +5°C'de depolama esnasında membran lipidlerinin peroksidasyona uğramasını engelleyerek spermatozoon membran bütünlüğünü koruduğunu bildirmişlerdir.

Sharma ve Agarwal (125), in vitro fertilizasyon için kullanılan spermaya vitamin C ilave edilmesinin faydalı olduğunu, çünkü seminal plazmada bulunan

antioksidantların in vitro fertilizasyon sırasında reaktif oksijen türlerinin hücumuna karşı spermatozoon membranını korumada yetersiz kaldıklarını bildirmişlerdir.

Sanchez-Partida ve ark. (118), düşük konsantrasyonlarda gliserol ilave edilerek sulandırılmış spermalara, düşük miktarlarda vitamin C ilave edilmesinin fertilite ve motilite oranları üzerine faydalı etkilerinin olabileceğini ileri sürmektedirler.

Öte yandan vitamin C miktarının spermada belli bir seviyenin üzerine çıkmasının spermatozoon motilitesinde bir azalmaya neden olduğu da bildirilmektedir (37).

Bu çalışma, koçlara parenteral yolla uygulanan vitamin C'nin spermatolojik özellikler üzerine etkisi ile elektroejakülatörle alınarak pooling yapılan koç spermalarına farklı oranlarda katılan gliserol ve vitamin C'nin, spermanın dondurulabilirliği ve dolayısıyla spermatolojik özelliklere etkisini araştırılmak amacıyla yapılmıştır.



4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. GEREÇ

Araştırmada hayvan materyali olarak Elazığ bölgesindeki sürülerde damızlık olarak bulundurulmuş, klinik olarak sağlıklı, 2 yaşlarında 6 Akkaraman koç kullanıldı. Çalışma öncesinde 2 ay süreyle ve çalışma esnasında tüm koçlar Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde kapalı şartlarda aynı rasyonlarla beslendi. Koçların beslenmesi için kesif yem olarak % 46 arpa, % 20 kepek, % 30 ayçiçeği tohumu küspesi, % 1 vitamin karması, % 1 tuz, % 1 mineral ve % 1 mermer tozundan oluşan rasyon kullanıldı. Sözkonusu rasyondan koç başına sabah 500 gr ve akşam 500 gr olmak üzere günlük olarak 1 kg ve buna ek olarak yine koç başına 2 kg kuru yonca günlük olarak verildi. Ayrıca araştırma başlamadan 2 ay önce hayvanlar iç ve dış parazitlere karşı ilaçlandı.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. Koçlara Kas İçi Enjekte Edilen Vitamin C'nin Spermatolojik Özelliklere Etkisinin Belirlenmesi

Araştırmanın birinci kısmında herhangi bir uygulama yapılmaksızın 6 koçtan bir ay süreyle 3'er gün aralıklarla kan ve elektroejakülatör yardımıyla sperma alındı (n=10). Alınan spermaların spermatolojik özellikleri belirlendikten sonra kan serumu ve sperma örneklerinin vitamin C düzeyleri ölçüldü. Bu kısımda elde edilen değerler araştırmanın kontrol grubunu oluşturdu. Daha sonra aynı koçlara bir ay süreyle günlük 20 mg/kg olmak üzere kas içi vitamin C (İnjakom-C – Roche) enjeksiyonları yapıldı. Günlük enjeksiyonlar sırasında 3'er gün aralıklarla enjeksiyonlardan 4 saat sonra hayvanlardan sperma ve kan örnekleri alındı (n=10). Alınan spermaların spermatolojik özellikleri belirlendikten sonra kan serumu ve sperma örneklerinin vitamin C düzeyleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar araştırma grubu olarak kaydedildi ve istatistiki yönden kontrol grubu ile birlikte değerlendirildi.

4.2.1.1. Spermanın Alınması

Sperma koçlardan elektroejakülatör yöntemiyle alındı. Bu işlem esnasında koç bir yanı üzerine yere yatırıldı. Koçun ön ayakları ile başı ön tarafa ve arka ayakları da arka tarafa doğru uzatılıp gerdirilerek hareketleri sınırlandırıldı. Preputiumun fazla kılları kırılarak uç kısmı kağıt havlu ile temizlendi. Çeşme suyu

ile ısıtılıp kayganlaştırılan prob koçun rectumuna yerleştirildi. Probun dışta kalan kısmına bastırılarak ön tarafındaki iletken levhaların, sacrumun alt tarafında, ek salgı bezlerinin hemen üzerinde bulunan ve genital organları innerve eden sinirlere temas etmesi sağlandı. Bir yardımcı da spermayı almak için toplama kadehini prepitiumun ucuna yakın tutarak bekledi. Elektroejakülatör çalıştırıldıktan sonra 3-5 Volt'luk düşük voltajlarla başlayıp 1'er Volt'luk artışlarla 5-7 saniyelik aralıklarla 2-3 saniye süren uyarımlar verilerek ortalama 4-7 uyarım sonucu ereksiyon ve ejakülasyon sağlandı (28). Ejakülasyon esnasında iplik şeklinde devam eden urethral çıkış deliğinin sperma toplama tüpü içerisine alınmasına özen gösterildi. Sperma toplama tüplerine alınan spermalar gerekli muayenelerin yapılması için laboratuvara götürülerek 37°C'ye ayarlanmış benmariye yerleştirildi.

4.2.1.2. Spermanın Muayenesi

4.2.1.2.1. Hacmi

Sperma hacmi, sperma toplama tüpü üzerindeki ölçü çizgilerine göre okunarak "ml" olarak kaydedildi.

4.2.1.2.2. Kitle Hareketi

Sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış ısıtma tablasına yerleştirilen lam üzerine küçük bir damla sperma konuldu. Lam üzerine lamel kapatılmadan 10X10'luk büyütmede kitle hareketi incelendi. Değerlendirme, ileri yönde güçlü hareket eden spermatozoonların oluşturduğu, kaynama veya dalgaların girişimi şeklindeki hareketlerin oluş derecesi göz önüne alınarak 2 farklı sahada 0 ile 5 arasında bir puan verilerek yapıldı (18, 62).

4.2.1.2.3. Motilite

Önce sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış mikroskobun ısıtma tablasına temiz bir lam yerleştirilerek ısıtıldı. Sonra lam üzerine toplu iğne başı büyüklüğünde sperma konularak aynı sıcaklıktaki %3'lük sodyum sitrat solüsyonu ile yaklaşık 1:10 oranında sulandırıldı. Üzerine 45° eğimle lamel kapatıldı. Mikroskop altında 10X40'luk büyütmede motilite belirlendi. Değerlendirme, ileri yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz ve diğer hareket biçimlerini gösterenlere oranı şeklide, 3-5 farklı sahada ve %0-100 arasında değer verilerek yapıldı (18, 62).

4.2.1.2.4. Yoğunluk

Spermatozoon yoğunluğu hemositometrik yöntem kullanılarak belirlendi (18, 41). Bu amaçla eritrosit sayımında kullanılan pipetin 0.5 çizgisine kadar sperma,

101 çizgisine kadar da %2'lik Eosin solüsyonu çekilerek 1:200 oranında sulandırma gerçekleştirildi. Daha sonra pipetin her iki ucu parmakla kapatılıp yatay konumda 30 cm'lik mesafede 100 defa şiddetle ileri geri sallanarak karışım sağlandı. Bu işlemi takiben ilk 5 damla pipetten dışarı atıldı. Daha önceden hazırlanmış Thoma lamı üzerine sayım alanını örtecek şekilde sulandırılmış sperma konuldu. Thoma lamı üzerinde spermatozoonların pasif hareketlerinin durması için 5 dakika beklendi. Spermatozoon sayımı 10X40'luk büyütmede her iki sayım alanında beşer orta karedeki spermatozoon sayısının belirlenmesiyle gerçekleştirildi. Yoğunluğun hesaplanması aşağıdaki formülden yararlanılarak yapıldı.

$$\text{Spermatozoon Yoğunluğu (Sayı /ml)} = \frac{\text{Sayılan Spermatozoon Sayısı}}{\text{Sayılan Küçük Kare Sayısı}} \times \text{Toplam Küçük Kare Sayısı (400)} \times \text{Thoma Laminin Derinliği (10)} \times \text{Sulandırma Oranı (200)} \times 1000 \text{ mm}^3$$

4.2.1.2.5. Morfolojik Muayene

Spermatozoonların morfolojik yapılarının incelenmesi amacıyla "Hancock Solüsyonu" kullanıldı (18, 62). Bu amaçla 0.5 ml Hancock solüsyonu içeren deney tüpüne bir damla sperma damlatılarak tespit edildi. Hazırlanan karışımdan 1 damla lam üzerine konularak üzeri lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında immersiyon okjektifi (15X100) ile incelendi. Toplam 400 spermatozoon sayılarak anormal olanların oranı belirlendi. Morfolojik muayenenin değerlendirilmesi sonucu toplam anormal spermatozoon oranı içerisinde akrozoma bağlı bozuklukların oranı da ayrıca belirlendi.

Hancock solüsyonu :

1. Solüsyon:	NaCl	1.13 g
	Bidistile su add.	62.50 ml
2. Solüsyon:	a) Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	2.71 g
	Bidistile su add.	62.50 ml
	b) K ₂ HPO ₄	2.78 g
	Bidistile su add.	62.50 ml
	25 ml (a) + 10 ml (b) karıştırılır.	
Hancock Solüsyonu :	1. Solüsyon	18.75 ml
	2. Solüsyon	12.50 ml
	Formalin	7.81 ml
	Bidistile su add.	62.50 ml.

Hancock solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler

- NaCl(MERCK – Art Nr: 06400)
- Na₂HPO₄.2H₂O (MERCK – Art Nr: 06580)
- K₂HPO₄ (MERCK – Art Nr: 06100)
- Formalin(MERCK – Art Nr: 04002)

4.2.1.2.6. Ölü-Canlı Muayenesi

Spermadaki ölü spermatozoon oranını belirlemek amacıyla eoson-nigrosin boyama metodu kullanıldı (18, 77). Ölü-canlı oranının belirlenmesi amacıyla froti hazırlanırken kullanılan lam, lamel ve cam pipetlerin sıcaklığının 37°C olmasına özen gösterildi. Bir pipetle lam üzerine bir damla sperma ve 2-3 damla eosin-nigrosin boyasından damlatılıp karıştırıldı. Bu karışımdan aynı veya farklı bir lam üzerine froti çekilerek sıcak hava etkisi altında kısa sürede kuruması sağlandı. Mikroskopun 10X40'lık büyütmesi altında her bir frotide toplam 100 spermatozoon sayıldı. Değerlendirmede, baş kısmı tam boya alan spermatozoonlar ile yarım boya alan spermatozoonlar ölü hiç boya almayan spermatozoonlar ise canlı olarak kabul edildi. Sonuçta ölü spermatozoonların oranı yüzde olarak belirlendi.

Eosin-Nigrosin Boyası :

Eosin	1.0 g
Nigrosin	5.0 g
Sodium Citrate Dihidrate (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O).....	2.9 g
Bidistile su add.	100 ml

Eosin-Nigrosin boyasının hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler

- Eosin (MERCK – Art Nr: 15935)
- Nigrosin (MERCK – Art Nr: 50420)
- Sodium Citrate Dihidrate (MERCK – Art Nr: 06432)

4.2.1.2.7. pH Değerinin Ölçümü

Spermanın pH'sı 0.5 birim aralıklı pH test kağıtlarıyla belirlendi. Bu amaçla test kağıtının spermaya teması sağlanarak 3-5 sn bekletildi. Bu sürenin sonunda renk değişiminin skala üzerinde gösterdiği sayısal değer okunarak kaydedildi.

4.2.1.3. Sperma ve Kanda Vitamin C Düzeylerinin Belirlenmesi

Koçlardan alınan kan serumu ve sperma örneklerinde vitamin C düzeylerinin belirlenmesi amacıyla spektrofotometrik bir yöntem olan fosfotungustik asit metodu (84) kullanıldı.

4.2.1.3.1. Renk Ayracının Hazırlanması

A Solüsyonu : 20 g Sodium Tungstate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 10 g Disodium Hydrogen Phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) karışımı 30 ml distile su içinde ısıtılarak çözündürüldü.

B Solüsyonu : 5 ml sülfürik asit (H_2SO_4 - molekül ağırlığı 1.84) üzerine yavaş bir şekilde 15 ml distile su ilave edildi.

Solüsyon B yavaş bir şekilde ılık durumdaki solüsyon A üzerine aktarıldı. Elde edilen karışım reflux (geri soğutucu) altında 2 saat süreyle kısık ateşte kaynatıldı. Elde edilen solüsyon (renk ayracı) oda sıcaklığında soğutuldu. Daha sonra kapalı bir bölmede aynı sıcaklıkta saklandı.

4.2.1.3.2. Standart Solüsyonların Hazırlanması

Stok Standart

Önceden tartılan 5 g Oksalik Asit ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp çözündürüldü. Daha sonra 50 mg L-askorbik asit, hazırlanan %0.5'lik oksalik asit solüsyonu ile 100 ml'ye tamamlanıp çözündürüldü. Bu solüsyon stok standart olarak 4°C'de saklandı.

Çalışma Standardı

Stok standarttan 1 ml alınıp %0.5'lik oksalik asit solüsyonu ile 50 ml'ye tamamlandı. Bu işlemle 50 kez daha sulandırılmış olan stok standarttan 1 mg/100 ml konsantrasyonunda çalışma standardı elde edildi. Ölçümler öncesinde çalışma standartları taze olarak hazırlandı.

Vitamin C düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal maddeler

- Sodium Tungstate..... (MERCK – Art Nr: 06673)
- Disodium Hydrogen Phosphate (MERCK – Art Nr: 06580)
- Sülfürik Asit (mol ağırlığı 1.84) (MERCK – Art Nr: 00713)
- Oksalik Asit (MERCK – Art Nr: 00492)
- L-Askorbik Asit (MERCK – Art Nr: 00127)

4.2.1.3.3. Kan Serumlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan 6 koçtan sperma alındıktan hemen sonra kan örnekleri de alındı. Hayvanların vena jugularisi üzerine rastlayan kısımdaki yünler kırılarak bölgenin alkolle dezenfeksiyonu yapıldı. Söz konusu hayvanların vena jugularisinden steril iğneler yardımıyla kan alma tüplerine 10'ar ml kan alındı. Alınan kan örnekleri pıhtı teşekkül edinceye kadar 37°C'deki etüvde 1 saat bekletildi. Pıhtı oluşan örnekler, ince steril bir metal çubukla tüpün iç yüzeyine teğet olarak pıhtı bozulmadan çepeçevre çizildi. Daha sonra tekrar 37°C'lik etüve konularak 1 saat daha bekletildi. Sürenin sonunda tüpler 700 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üst kısımlarında toplanan serumlardan otomatik pipetle 2'şer ml alınarak steril cam tüplere aktarıldı.

4.2.1.3.4. Spermaların Hazırlanması

Araştırmadaki 6 koçtan alınan spermaların 37°C'de spermatolojik muayenelerinin yapılmasının ardından her bir örnekten otomatik pipetle 0.2 ml sperma alınarak steril cam tüplere konuldu. Daha sonra tüplere konulan bu örnekler, %0.5'lik oksalik asit solüsyonu ile 10 kat sulandırılarak 2 ml'ye tamamlandı.

4.2.1.3.5. Standart Kontrolü

Hazırlanan standart solüsyonün hassasiyetini belirlemek amacıyla stok standart solüsyondan sırasıyla 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 (çalışma standardı) ve 2.0 ml alınarak % 0.5'lik oksalik asit solüsyonu ile 50 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyonlar gerekli aşamalardan geçirildikten sonra spektrofotometrede okunarak değerler kaydedildi. Uygulamalar beş kez tekrar edildi (n=5).

4.2.1.3.6. Kan Serum ve Sperma Vitamin C Düzeylerinin Ölçülmesi

Ayrı ayrı steril santrifüj tüplerine 2'şer ml olarak konan kan serumları, sperma örnekleri, çalışma standardı ve distile su üzerine otomatik pipet yardımıyla 2'şer ml renk ayracı ilave edildi. Vortexte karıştırılan örnekler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Bu esnada reaksiyon tamamlanıp renk sabitlendi. Daha sonra tüpler 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

Örnekler santrifüj edildikten sonra üstte kalan mavi renkli kısımlar (süpernatantlar) otomatik pipet yardımıyla alttaki tortuya dokunulmaksızın dikkatli bir şekilde alınarak başka bir test tüpüne aktarıldı. Elde edilen örnekler

spektrofotometre’de (SHİMADZU - UV. Vis Marka) sırasıyla aynı özel cam quartz tüp kullanılarak 700 nm’de köre (distile suya) karşı okundu.

Hesaplama:

Kan Örnekleri için;

$$\frac{\text{Testin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times \text{Standartın Konsantrasyonu (mg/100 ml)} = \text{Mg Askorbik asit / 100 ml}$$

Sperma Örnekleri İçin;

$$\frac{\text{Testin Absorbansı} \times 10}{\text{Standartın Absorbansı}} \times \text{Standartın Konsantrasyonu (mg/100 ml)} = \text{Mg Askorbik asit / 100 ml}$$

4.2.2. Benzer Yöntemlerle Alınarak Pooling Yapılan Koç Spermasına Farklı Oranlarda Katılan Gliserol ve Vitamin C’nin Dondurmadan Önce ve Çözdürdükten Sonraki Spermatolojik Özelliklere Etkisinin Belirlenmesi

4.2.2.1. Sulandırıcıların Hazırlanması

Çalışmada sperma sulandırıcısı olarak “Yumurta Sarısı - Tris Sulandırıcısı” kullanıldı.

Yumurta sarısı - Tris Sulandırıcısı :

Tris (hydroxymetyl) aminomethane	3.63 g
Glikoz	0.50 g
Sitrik asit	1.99 g
Yumurta Sarısı	15.00 ml
Distile su add.	100.00 ml

Yumurta Sarısı - Tris sulandırıcısının hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler;

- Tris(hydroxymethyl) aminomethane (MERCK – Art Nr: 08387)
- D(+) Glikoz (MERCK – Art Nr: 08337)
- Sitrik Asit (MERCK – Art Nr: 00242)
- Oksalik Asit (MERCK – Art Nr: 00492)
- Gliserol (MERCK – Art Nr: 04093)

4.2.2.2. Ön Sulandırıcının Hazırlanması

Sperma alınmadan 1 saat önce tartılarak hazırlanmış olan tris, glikoz ve sitrik asit 40-50°C'ye kadar ısıtılmış olan 50 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Daha sonra sıcaklığı 37°C'ye düşürüldü. Günlük olarak alınan taze yumurtaların akı sarısından filtre kağıdı yardımıyla ayrıldıktan sonra hazırlanan solüsyona 15 ml yumurta sarısı ilave edildi. Karışıma 100.000 IU Penisilin ve 100 mg Streptomisin eklenerek hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan ön sulandırıcı 37°C'deki su banyosuna konuldu.

4.2.2.3. Ön Sulandırma İşlemi

Araştırmanın ikinci kısmında elektrojekülatör yöntemiyle 2 ay süreyle 3 günde bir 6 koçtan sperma alındı. Alınan spermalar 37°C'de pooling yapılarak bir kapta toplandı. Daha sonra pooling, 37°C'deki ön sulandırıcının spermaya yavaş yavaş katılmasıyla 1:4 oranında (1 kısım sperma : 4 kısım sulandırıcı) sulandırıldı. Sulandırma sonrası spermatolojik özellikler belirlenerek kaydedildi.

4.2.2.4. Spermanın Soğutulması

Ön sulandırılması yapılmış tüp içerisindeki pooling, sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış su dolu bir kap içerisine daldırılarak buzdolabına bırakıldı. Burada yaklaşık 2 saat bekletilerek sıcaklığının 4°C'ye düşmesi sağlandı. Soğutulma sonrası spermatolojik özellikler belirlenerek kaydedildi.

4.2.2.5. Spermaya Katılan Vitamin C'nin Toksisitesinin Belirlenmesi

Çalışmanın ikinci bölümünde spermaya katılacak vitamin C (L-askorbik asit) miktarlarının belirlenmesi için bir ön çalışma yapıldı. 6 koçtan alınan spermalar bir tüp içinde bir araya toplandıktan sonra (pooling), 1:4 oranında ön sulandırılması yapıldı. Daha sonra tüp, 37°C'deki su içerisinde buzdolabına bırakılarak sıcaklığı 4°C'ye düşürüldü. Soğutulmuş sperma 8 eşit kısma bölündü. Her bir kısma sırasıyla 0 mg/ml (kontrol), 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 ve 10.0 mg/ml Vitamin C ilave edilip, müteakip 0., 2., 4., 8., 16. ve 24. saatlerde spermatozoon motilitesi ve sperma pH değerleri belirlenerek kaydedildi. Bu işlemler beş kez tekrarlandı (n=5).

4.2.2.6. Farklı Oranlarda Gliserol ve Değişik Miktarlarda Vitamin C İlave Edilen Sulandırıcıların Hazırlanması

Önceden tartılarak hazırlanmış olan tris, glikoz ve sitrik asit 40-50°C'ye ısıtılmış 40 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Sonra sıcaklığı 37°C'ye düşürüldü. Filtre kağıdı yardımıyla akından ayrılan 15 ml taze yumurta sarısı hazırlanan

solüsyona ilave edilerek karışım distile su ile 60 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan 60 ml'lik karışım 5 eşit kısma bölündü. Daha sonradan 20 ml'ye tamamlanacak olan her bir kısma sırasıyla 0 ml (%0-A), 0.4 ml (%2-B), 1.2 ml (%6-C), 2.0 ml (%10-D) ve 2.8 ml (%14-E) gliserol ilave edilerek bütün kısımlar distile su ile 16 ml'ye tamamlandı. Karışımlar buzdolabına yerleştirilerek sıcaklıklarının 4°C'ye düşmesi sağlandı. Farklı oranlarda gliserol içeren bu 5 grup kendi aralarında tekrar 4 ml'lik 4 gruba ayrıldı. Aynı oranda gliserol içeren her bir 4 ml'lik alt gruba sırasıyla 0 mg/ml (kontrol-1), 1 mg/ml (2), 2 mg/ml (3) ve 4 mg/ml (4) vitamin C ilave edilerek 5 ml'ye tamamlandı. Sonuç olarak 5'er ml hacimde değişik oranlarda gliserol ve vitamin C içeren 20 farklı sulandırıcı grubu elde edildi. Burada yüzde ve mg olarak verilen değerler sadece sulandırıcılara ait olup sperma 1:1 oranında tekrar sulandırıldığında bu değerler yarıya düşmektedir.

4.2.2.7. Gliserolasyon

Daha önceden 1:4 oranında ön sulandırması yapılmış ve sıcaklığı 4°C'ye düşürülmüş pooling, 1'er ml'lik 20 eşit kısma bölündü. Her bir kısım sperma, değişik oranlarda gliserol ve vitamin C içeren bir sulandırıcı ile 1:1 oranında (1 kısım sperma:1 kısım sulandırıcı) sulandırıldı. Sulandırma işlemi, 4 eşit kısma bölünen sulandırıcının her bir kısmının 15 dakika aralıklarla spermaya eklenmesi şeklinde yapıldı.

4.2.2.8. Equilibrasyon

Sulandırılmış ve gliserolasyon işlemi tamamlanmış olan spermalar farklı renklerdeki 0.25 ml'lik payetlere çekilerek bunların uçları polivinil alkol tozu ile kapatıldı. Hazırlanmış olan payetler, equilibrasyon amacıyla 4°C'de 4 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda spermatolojik özellikler belirlenerek kaydedildi.

4.2.2.9 Spermanın Dondurulması

Equilibrasyon sonunda buzdolabından çıkarılan payetler, 7 cm derinliğinde sıvı azot ihtiva eden bir sterafor kab (26 x 17 x 14 cm) içerisinde yüzen, orta kısmı çıkarılmış ve üst tarafı boydan boya madeni kafes teli ile kaplanmış dikdörtgen prizması şeklindeki sert sterafor blok (18 x 12 x 5 cm) üzerine bir sıra halinde yerleştirildi. Sterafor kutunun kapağı kapatılarak payetler içerisindeki spermaların sıvı azot buharında 12 dakika süreyle dondurulması sağlandı. Bu sürenin sonunda sterafor blok üzerindeki payetler, sterafor kaptaki sıvı azot içine döküldü. Daha sonra

payetler sıvı azot içerisinde gobletlere yerleştirilerek sıvı azot tankına taşındı. Muayeneler tamamlanıncaya kadar burada saklandı.

4.2.2.10. Dondurulmuş Spermanın Çözdürülmesi

Spermaların dondurulması sonucu spermatolojik özelliklerinin belirlenmesi için her bir gruba ait payetler dondurma işleminden yaklaşık 1 saat sonra 38°C'deki su içerisinde 25 saniye bekletilerek çözdürüldü. Gerekli spermatolojik muayeneler yapılarak sonuçlar kaydedildi.

Araştırma ikinci aşamasındaki spermanın sulandırılması, gliserolasyon, equilibrasyon, spermanın dondurulması ve çözdürülmesi işlemleri 10 kez tekrarlanarak değerlendirildi (n=10).

4.2.3. İstatistiki Analiz

Araştırmada incelenen gruplar arasındaki spermatolojik özelliklere ilişkin verilerin istatistiki karşılaştırmaları için SPSS istatistik programından yararlanıldı. Vitamin C enjeksiyonu önce ve sonrasına ait değerler için bağımlı T testi ve yüzde değerlerinin önemlilik derecelerinde Khi kare testi kullanıldı. Dondurma öncesi ve sonrası spermatolojik özelliklerin değerlendirilmesinde gruplar arası varyans analizi (ANOVA) yapıldı. Varyans analizinden elde edilen gruplar arası farklar Fischer'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirildi.

5. BULGULAR

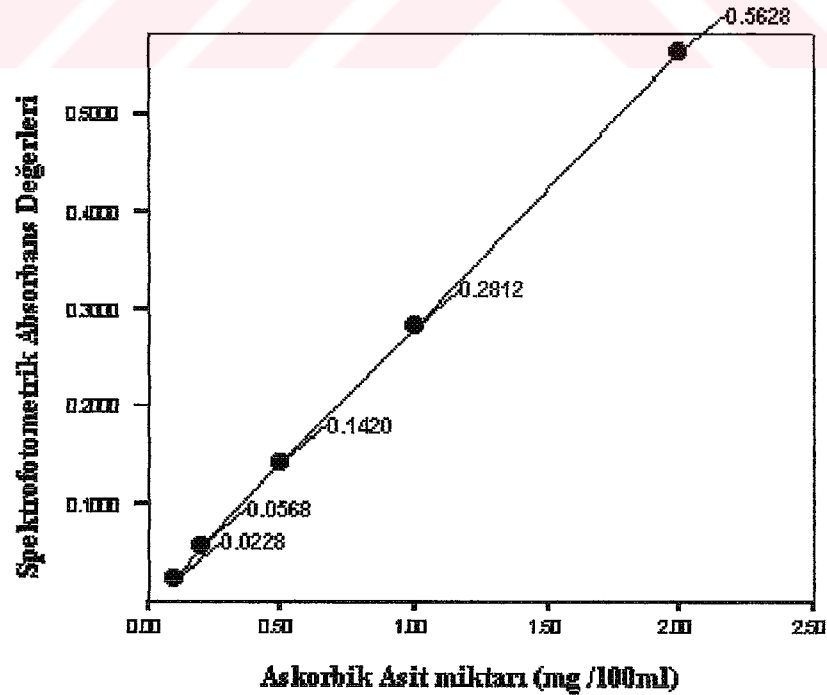
5.1. Standart Kontrolü

Hazırlanan standart solüsyonların hassasiyetini belirlemek amacıyla yapılan spektrofotometrik ölçümlerin ortalama değerleri Tablo 1’ de gösterilmiştir.

Tablo 1. Standart Kontrolü (Değişik Miktarda Vitamin C İçeren Solüsyonların Spektrofotometrik Ölçüm Değerleri) (n=5)

Vitamin C Miktarı (mg/100 ml)	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
Absorbans Değeri	0.0228	0.0568	0.1420	0.2812	0.5628

Tablo 1’de görüldüğü gibi 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/100 ml Vitamin C içeren solüsyonların spektrofotometrik ölçümleri sonucunda ortalama absorbans değerleri sırasıyla 0.0228, 0.0568, 0.1420, 0.2812 ve 0.5628 olarak bulunmuştur. Bu değerlerin grafiksel dağılımı da grafik 1’de gösterilmiştir.



Grafik 1. Standart Kontrolün Spektrofotometrik Ölçümlerinin Grafiksel Dağılımı

Grafik 1’de görüldüğü gibi standart absorbans değerleri düzgün bir dağılım göstermektedir. Elde edilen bulgular, mevcut metodun solüsyonlarda düşük miktarlarda bulunan vitamin C miktarlarının tespitine karşı hassas olduğunu göstermektedir.

5.2. Vitamin C Enjeksiyonlarından Önce ve Sonra Elde Edilen Kan Serum ve Spermallerdeki Vitamin C Düzeyleri

Araştırmada kullanılan 6 koça vitamin C enjekte etmeden önce ve ettikten sonra ölçülen kan serumu ve spermallerdeki vitamin C düzeyleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2’de görüldüğü gibi vitamin C enjeksiyonları yapılmadan önce koçların kan serumundaki ortalama vitamin C düzeyleri 0.361 ± 0.01 mg/100 ml ile 0.488 ± 0.01 mg/100 ml arasında değişmiş ve 6 koça ortalama 0.427 ± 0.01 mg/100 ml olarak bulunmuştur. Vitamin C enjeksiyonları yapıldıktan sonra ise bu değerler 1.311 ± 0.06 mg/100 ml ile 1.871 ± 0.06 mg/100 ml arasında değişmiş ve 6 koç için ortalama 1.596 ± 0.03 mg/100 ml olarak belirlenmiştir. Koçlara vitamin C uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra elde edilen kan serumundaki ortalama vitamin C düzeyleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$).

Tablo 2. Vitamin C Enjeksiyonundan Önce ve Sonra Koçların Kan Serum ve Spermasındaki Vitamin C Düzeyleri (n=10).

Koçlar	Kan Serumundaki Vitamin C Düzeyleri (mg / 100 ml)			Spermadaki Vitamin C Düzeyleri (mg / 100 ml)		
	Enjeksiyon Öncesi	Enjeksiyon Sonrası	P	Enjeksiyon Öncesi	Enjeksiyon Sonrası	P
1	0.361 ± 0.01	1.326 ± 0.04		2.654 ± 0.13	3.371 ± 0.07	
2	0.379 ± 0.01	1.311 ± 0.06		2.704 ± 0.16	3.311 ± 0.07	
3	0.443 ± 0.01	1.871 ± 0.06		3.623 ± 0.10	4.054 ± 0.10	
4	0.454 ± 0.01	1.675 ± 0.05		3.796 ± 0.13	4.014 ± 0.11	
5	0.488 ± 0.01	1.645 ± 0.04		3.894 ± 0.12	4.472 ± 0.08	
6	0.467 ± 0.01	1.776 ± 0.04		3.663 ± 0.07	4.282 ± 0.09	
Ortalama	0.427 ± 0.01	1.596 ± 0.03	**	3.384 ± 0.08	3.915 ± 0.07	**

** : ($P < 0.01$).

Tablo 2’de görüldüğü gibi vitamin C enjeksiyonları yapılmadan önce koçların spermasındaki ortalama vitamin C düzeyleri 2.654 ± 0.13 mg/100 ml ile 3.894 ± 0.12 mg/100 ml arasında değişmiş ve 6 koçta ortalama 3.384 ± 0.08 mg/100 ml olarak bulunmuştur. Vitamin C enjeksiyonları yapıldıktan sonra ise bu değerler 3.311 ± 0.07 mg/100 ml ile 4.472 ± 0.08 mg/100 ml arasında değişmiş ve 6 koç için ortalama 3.915 ± 0.07 mg/100 ml olarak belirlenmiştir. Koçlara vitamin C uygulanmadan önce ve sonra elde edilen spermalarındaki ortalama vitamin C düzeyleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$).

5.3. Koçlara Kas İçi Enjekte Edilen Vitamin C’nin Spermatolojik Özelliklere Etkisi

Bu çalışmada koçlara vitamin C uygulanmadan önce ve sonra alınan 10’ar ejakulat spermaya ait ortalama miktar, kitle hareketi, spermatozoon motilitesi ve spermatozoon yoğunluğu Tablo 3.1’de ve ölü spermatozoon oranı, akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı, toplam anormal spermatozoon oranı ve sperma pH değerleri de Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1’de görüldüğü gibi vitamin C enjeksiyonları yapılmadan önce koçların ortalama sperma miktarı 0.85 ± 0.04 ml ile 1.16 ± 0.03 ml arasında değişmiş ve 6 koçta ortalama 1.02 ± 0.02 ml olarak bulunmuştur. Vitamin C enjeksiyonları yapıldıktan sonra ise bu değerler 1.08 ± 0.04 ml ile 1.24 ± 0.02 ml arasında değişmiş ve 6 koç için ortalama 1.18 ± 0.02 ml olarak belirlenmiştir. Koçlara vitamin C uygulanmadan önce ve sonra elde edilen ortalama sperma miktarları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Tablo 3.1’de görüldüğü gibi vitamin C enjeksiyonları yapılmadan önce koçların spermalarındaki ortalama kitle hareketleri 3.90 ± 0.07 ile 4.10 ± 0.07 arasında değişmiş ve 6 koçta ortalama 4.03 ± 0.03 olarak bulunmuştur. Vitamin C enjeksiyonlarından sonra ise bu değerler 4.10 ± 0.07 ile 4.20 ± 0.08 arasında değişmiş ve 6 koç için ortalama 4.13 ± 0.03 olarak belirlenmiştir. Koçlarda vitamin C uygulanmadan önce ve sonra elde edilen ortalama sperma kitle hareketleri arasındaki farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu görülmüştür ($P > 0.05$).

Yine tablo 3.1’den izlenebileceği gibi vitamin C enjeksiyonları yapılmadan önce koçların spermalarındaki ortalama spermatozoon motilitesi oranları $\%79.0 \pm 0.80$ ile $\%81.6 \pm 0.50$ arasında değişmiş ve 6 koçta ortalama $\%80.7 \pm 0.31$ olarak

Tablo 3.1 Koçlara Vitamin C Enjeksiyonları Yapılmadan Önce ve Sonraki Spermatolojik Özellikler (n=10)

Vitamin C Enjeksiyonundan Önce ve Sonraki Spermatolojik Özellikler											
Koç	Sperma Miktarı (ml)		Kitle hareketi (0-5 Puan)		Motilite (%)		Yoğunluk ($\times 10^9$ /ml)		P	P	P
	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra			
1	0.90±0.04	1.14±0.05	3.90±0.07	4.10±0.07	80.0±1.07	82.2±0.47	2.015±0.056	2.620±0.089			
2	0.85±0.04	1.08±0.04	3.95±0.09	4.10±0.07	79.0±0.80	82.0±0.60	2.310±0.071	2.825±0.075			
3	1.08±0.03	1.22±0.03	4.10±0.07	4.15±0.08	81.4±0.67	82.2±0.63	2.910±0.046	3.140±0.064			
4	1.16±0.03	1.24±0.02	4.10±0.07	4.15±0.08	81.6±0.50	82.6±0.67	2.780±0.046	3.165±0.063			
5	1.09±0.02	1.19±0.05	4.05±0.09	4.20±0.08	81.0±0.75	82.6±0.60	2.880±0.047	3.170±0.063			
6	1.02±0.02	1.18±0.04	4.05±0.09	4.10±0.07	81.2±0.53	81.8±0.63	3.165±0.055	3.240±0.063			
Ortalama	1.02±0.02	1.18±0.02	4.03±0.03	4.13±0.03	80.7±0.31	82.2±0.24	2.677±0.055	3.027±0.040	*	-	*

- : (P>0.05)

* : (P<0.05)

Tablo 3.2. Koçlara Vitamin C Enjeksiyonları Yapılmadan Önce ve Sonraki Spermatolojik Özellikler (n=10)

Vitamin C Enjeksiyonundan Önce ve Sonraki Spermatolojik Özellikler										
Koç	Ölü Spermatozoon Oranı (%)		Akrozoma Bağlı Anormal Spermatozoon Oranı (%)		Toplam Anormal Spermatozoon Oranı (%)		PH Değeri		P	P
	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra		
1	11.84±0.48	10.28±0.30	2.84±0.09	2.56±0.11	9.96±0.20	9.64±0.21	7.00±0.13	6.90±0.10		
2	11.32±0.56	9.80±0.16	2.26±0.11	2.08±0.07	10.93±0.30	10.74±0.30	6.90±0.13	6.75±0.08		
3	7.80±0.41	7.24±0.29	2.10±0.05	2.02±0.07	7.60±0.14	7.26±0.09	6.90±0.10	6.75±0.08		
4	8.50±0.15	8.00±0.84	1.74±0.08	1.80±0.08	7.94±0.12	7.62±0.14	6.75±0.08	6.70±0.08		
5	9.06±0.44	8.94±0.34	2.00±0.06	2.00±0.07	7.30±0.12	7.28±0.12	6.70±0.08	6.75±0.08		
6	9.42±0.44	9.03±0.25	1.84±0.12	1.84±0.10	8.40±0.24	8.20±0.18	6.85±0.08	6.80±0.08		
Ortalama	9.66±0.26	8.72±0.17	2.13±0.06	2.05±0.05	8.71±0.19	8.46±0.19	6.86±0.04	6.78±0.03	-	-

- : (P>0.05).

bulunmuştur. Vitamin C enjeksiyonlarından sonra ise bu değerler $\%81.8 \pm 0.63$ ile $\%82.6 \pm 0.67$ arasında değişmiş ve 6 koç için ortalama $\%82.2 \pm 0.24$ olarak belirlenmiştir. Koçlarda vitamin C uygulanmadan önce ve sonra elde edilen ortalama spermatozoon motilitesi oranları arasındaki farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu görülmüştür ($P > 0.05$).

Tablo 3.1'den takip edilebileceği gibi vitamin C enjeksiyonları yapılmadan önce koçların spermalarındaki ortalama spermatozoon yoğunluğu $2.015 \pm 0.056 \times 10^9/\text{ml}$ ile $3.165 \pm 0.055 \times 10^9/\text{ml}$ arasında değişmiş ve 6 koçta ortalama $2.677 \pm 0.055 \times 10^9/\text{ml}$ olarak bulunmuştur. Vitamin C enjeksiyonları yapıldıktan sonra ise bu değerler $2.620 \pm 0.089 \times 10^9/\text{ml}$ ile $3.240 \pm 0.063 \times 10^9/\text{ml}$ arasında değişmiş ve 6 koç için ortalama $3.027 \pm 0.040 \times 10^9/\text{ml}$ olarak belirlenmiştir. Koçlara vitamin C uygulanmadan önce ve sonra elde edilen ortalama spermatozoon yoğunluğu arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu görülmüştür ($P < 0.05$).

Tablo 3.2'de görüldüğü üzere vitamin C enjeksiyonları yapılmadan önce koçların spermalarındaki ortalama ölü spermatozoon oranları $\%7.80 \pm 0.41$ ile $\%11.84 \pm 0.48$ arasında değişmiş ve 6 koçta ortalama $\%9.66 \pm 0.26$ olarak bulunmuştur. Vitamin C enjeksiyonları yapıldıktan sonra ise bu değerler $\%7.24 \pm 0.29$ ile $\%10.28 \pm 0.30$ arasında değişmiş ve 6 koç için ortalama $\%8.72 \pm 0.17$ olarak belirlenmiştir. Koçlara vitamin C uygulanmadan önce ve sonra elde edilen ortalama ölü spermatozoon oranları arasındaki farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu görülmüştür ($P > 0.05$).

Tablo 3.2'de görüldüğü gibi vitamin C enjeksiyonları yapılmadan önce koçların spermalarındaki ortalama akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı $\%1.74 \pm 0.08$ ile $\%2.84 \pm 0.09$ arasında değişmiş ve 6 koçta ortalama $\%2.13 \pm 0.06$ olarak bulunmuştur. Vitamin C enjeksiyonları yapıldıktan sonra ise bu değerler $\%1.80 \pm 0.08$ ile $\%2.56 \pm 0.11$ arasında değişmiş ve 6 koç için ortalama $\%2.05 \pm 0.05$ olarak belirlenmiştir. Koçlarda vitamin C uygulanmadan önce ve sonra elde edilen ortalama akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranları arasındaki farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu görülmüştür ($P > 0.05$).

Tablo 3.2'den izlenebileceği gibi vitamin C enjeksiyonları yapılmadan önce koçların spermalarındaki ortalama toplam anormal spermatozoon oranları $\%7.30 \pm 0.12$ ile $\%10.93 \pm 0.30$ arasında değişmiş ve 6 koçta ortalama $\%8.71 \pm 0.19$ olarak bulunmuştur. Vitamin C enjeksiyonları yapıldıktan sonra ise bu değerler

%7.26±0.09 ile %10.74±0.30 arasında değişmiş ve 6 koç için ortalama %8.46±0.19 olarak belirlenmiştir. Koçlarda vitamin C uygulanmadan önce ve sonra elde edilen ortalama toplam anormal spermatozoon oranları arasındaki farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu görülmüştür ($P>0.05$).

Tablo 3.2’de görüldüğü gibi vitamin C enjeksiyonları yapılmadan önce koç spermalarının ortalama pH değerleri 6.70±0.08 ile 7.00±0.13 arasında değişmiş ve 6 koçta ortalama 6.86±0.04 olarak bulunmuştur. Vitamin C enjeksiyonları yapıldıktan sonra ise bu değerler 6.70±0.08 ile 6.90±0.10 arasında değişmiş ve 6 koç için ortalama 6.78±0.03 olarak tespit edilmiştir. Koçlarda vitamin C enjeksiyonları uygulanmadan önce ve sonra elde edilen ortalama pH değerleri arasındaki farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu görülmüştür ($P>0.05$).

5.4. Spermaya Katılan Vitamin C’nin Toksisitesi

Ön sulandırılması yapıp sıcaklığı 4°C’de düşürüldükten sonra 8 eşit kısma bölünen ve sırasıyla 0 mg/ml (kontrol), 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 ve 10.0 mg/ml miktarında Vitamin C ilave edilen spermaların 0., 2., 4., 8., 16. ve 24. saatlerdeki motilite ve pH değerleri Tablo 4’te gösterilmiştir.

Burada görüldüğü üzere, 0. saat ile 8.saat arasında 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/ml Vitamin C ilave edilen gruplar ile kontrol grubuna ait motilite değerleri değişmezken ($P>0.05$), 5 mg/ml vitamin C ilave edilen grupta motilite önemli derecede azalmış ($P<0.05$) ve 10 mg/ml vitamin C ilave edilen grupta ise %0 olmuştur ($P<0.05$). Öteyandan 16. ve 24. saatlerde, 0.1, 0.2, 0.5 ve 1 mg/ml Vitamin C ilave edilen gruplar ile kontrol grubuna ait motilite değerleri değişmezken ($P>0.05$), 2 mg/ml vitamin C ilave edilen grupta motilitenin kontrol grubuna göre azaldığı ($P<0.05$) ve 5 mg/ml vitamin C ilave edilen grupta ise %0’a indiği gözlenmiştir ($P<0.05$).

Yine tablo 4’te, 0. saat ile 24.saatler arasında 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/ml vitamin C ilave edilen gruplar ile kontrol grubuna ait pH değerleri arasındaki fark önemsiz bulunurken ($P>0.05$), 5 ve 10 mg/ml vitamin C ilave edilen gruplarda pH değerleri kotrol grubuna göre önemli derecede düşüş göstermiştir ($P<0.05$).

Tablo 4. Sıcaklığı 4°C Olan Spermaya Değişik Miktarlarda İlave Edilen Vitamin C'nin Spermatolojik Özelliklere Etkisi (n=5)

Spermatolojik Özellikler	Kontrol Zamanları (saat)	Spermaya İlave Edilen Vitamin C Miktarları (mg/ml)							
		0 (Kontrol)	0,1	0,2	0,5	1	2	5	10
Motilite	0. saat	82.4±0.87 ^a	81.6±0.75 ^a	82.0±0.82 ^a	81.2±0.66 ^a	79.6±0.70 ^a	78.0±0.82 ^a	39.2±0.80 ^b	0 ^c
	2. saat	82.0±0.82 ^a	81.2±0.66 ^a	80.4±0.40 ^a	79.6±0.70 ^a	77.6±0.87 ^a	76.0±1.00 ^a	34.8±1.02 ^b	0 ^c
	4. saat	81.2±0.66 ^a	79.6±0.70 ^a	77.6±0.87 ^a	78.4±0.75 ^a	75.6±1.01 ^a	75.2±1.02 ^a	27.6±1.19 ^b	0 ^c
	8. saat	80.4±0.40 ^a	76.4±0.98 ^a	76.0±1.00 ^a	77.2±0.92 ^a	73.6±0.98 ^a	74.0±1.00 ^a	4.8±1.02 ^b	0 ^c
	16. saat	77.6±0.87 ^a	75.6±1.01 ^{ab}	73.2±0.95 ^{ab}	75.2±1.02 ^{ab}	72.4±0.87 ^{ab}	69.6±0.70 ^{b*}	0 ^c	0 ^c
	24. saat	76.4±0.98 ^a	75.2±1.02 ^a	72.0±0.82 ^{ab}	73.6±0.98 ^{ab}	70.0±0.82 ^{ab}	68.4±0.87 ^{b*}	0 ^c	0 ^c
PH Değeri	0. saat	6.9±0.10 ^a	6.9±0.10 ^a	6.9±0.10 ^a	6.8±0.12 ^a	6.7±0.12 ^a	6.5±0.12 ^a	5.9±0.10 ^b	5.3±0.12 ^b
	2. saat	6.9±0.10 ^a	6.9±0.10 ^a	6.9±0.10 ^a	6.8±0.12 ^a	6.6±0.08 ^a	6.5±0.12 ^a	5.9±0.10 ^b	5.3±0.12 ^b
	4. saat	6.9±0.10 ^a	6.9±0.10 ^a	6.9±0.10 ^a	6.8±0.12 ^a	6.6±0.08 ^a	6.5±0.12 ^a	5.8±0.12 ^b	5.2±0.10 ^b
	8. saat	6.8±0.12 ^a	6.8±0.12 ^a	6.8±0.12 ^a	6.7±0.12 ^a	6.6±0.12 ^a	6.4±0.12 ^a	5.8±0.12 ^b	5.2±0.10 ^b
	16. saat	6.8±0.12 ^a	6.8±0.12 ^a	6.8±0.12 ^a	6.7±0.12 ^a	6.6±0.12 ^a	6.4±0.12 ^a	5.7±0.12 ^b	5.2±0.10 ^b
	24. saat	6.8±0.12 ^a	6.8±0.12 ^a	6.7±0.12 ^a	6.7±0.12 ^a	6.5±0.12 ^a	6.3±0.12 ^{ab}	5.7±0.12 ^{bc}	5.1±0.10 ^c

a,b,c : Aynı satır içerisinde değişik harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemlidir (P<0.05).

5.5. Farklı Oranlarda Gliserol İçeren Koç Spermasına Değişik Miktarlarda İlave Edilen Vitamin C'nin Dondurma Öncesi ve Sonrasında Spermatolojik Özelliklere Etkisi

5.5.1. Ön Sulandırılması Yapılmış Pooling'e Ait Spermatolojik Özellikler

Araştırmada kullanılan 6 koç sperması bir kapta toplanıp (pooling) 37°C'de ön sulandırması yapıldıktan sonraki ve 4°C'ye kadar soğutulduktan sonraki spermatolojik özellikleri Tablo 5'de sunulmuştur.

Tablo 5. Pooling Yapılan 6 Koç Spermasının 37°C'de Sulandırılmasından ve 4°C'ye Kadar Soğutulduktan Sonraki Spermatolojik Özellikler (n=10)

Pooling	Motilite (%)	Akrozoma Bağlı Anormal Spt. Oranı (%)	Toplam Anormal Spt. Oranı (%)	Ölü Spt. Oranı (%)	Ph Değeri
37°C'de Ön Sulandırmadan Sonra	82.4±0.84	2.54±0.05	8.65±0.06	6.26±0.17	6.90±0.10
4°C'ye Soğutulduktan Sonra	81.4±0.57	2.79±0.03	8.89±0.05	6.38±0.15	6.90±0.10

Tablo 5'de görüldüğü gibi, 37°C'de ön sulandırılması yapılan pooling'e ait motilite, akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı, toplam anormal spermatozoon oranı, ölü spermatozoon oranı ve pH değerleri sırasıyla, %82.4±0.84, %2.54±0.05, %8.65±0.06, %6.26±0.17 ve 6.90±0.10 bulunurken sulandırılmış spermanın 4°C'ye kadar soğutulmasından sonraki aynı değerler ise sırasıyla %81.4±0.57, %2.79±0.03, %8.89±0.05, %6.38±0.15 ve 6.90±0.10 olarak tespit edilmiştir. Soğutma esnasında pooling'in spermatolojik özelliklerinde meydana gelen değişikliklerde istatistiki olarak önemli bir fark görülmemiştir (P>0.05).

5.5.2. Gliserolasyon ve Equilibasyon Sonucu Elde Edilen Spermatolojik Özellikler

Değişik oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış 20 farklı grup spermanın, gliserolasyon ve equilibasyon sonucu tespit edilen spermatolojik özellikleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Farklı Oranlarda Gliserol ve Vitamin C İçeren Sulandırıcılarla Sulandırılmış Spermaların, Gliserolasyon ve Equilibrasyondan Sonraki Spermatolojik Özellikleri (n=10)

Gruplar (Gliserol - Vitamin C)	Motilite (%)	Akrozoma Bağlı Anormal Spt. Oranı (%)	Toplam Anormal Spt. Oranı (%)	Ölü Spt. Oranı (%)
A1 (%0 Gliserol- 0 mg/ml)	79.0±0.77 ^a	2.90±0.04 ^a	8.98±0.06 ^a	6.62±0.16 ^a
A2 (%0 Gliserol 0.5 mg/ml)	78.8±0.68 ^a	2.88±0.03 ^a	8.96±0.06 ^a	6.78±0.15 ^a
A3 (%0 Gliserol- 1 mg/ml)	78.0±0.70 ^{ab}	2.84±0.03 ^a	8.96±0.04 ^a	6.84±0.17 ^a
A4 (%0 Gliserol- 2 mg/ml)	77.2±0.70 ^{abc}	3.00±0.04 ^a	9.10±0.05 ^a	7.08±0.16 ^a
Ortalama	78.25±0.36 ¹	2.91±0.19 ¹	9.00±0.03 ¹	6.83±0.08 ¹
B1 (%1 Gliserol- 0 mg/ml)	77.8±0.72 ^{ab}	3.08±0.06 ^a	9.12±0.08 ^a	8.86±0.22 ^{ab}
B2 (%1 Gliserol- 0.5 mg/ml)	77.6±0.67 ^{abc}	3.12±0.05 ^a	9.13±0.05 ^a	8.70±0.23 ^{ab}
B3 (%1 Gliserol- 1 mg/ml)	76.4±0.74 ^{abcd}	3.01±0.05 ^a	9.11±0.06 ^a	8.94±0.22 ^{ab}
B4 (%1 Gliserol- 2 mg/ml)	74.0±0.81 ^{abcd}	3.34±0.07 ^a	9.28±0.05 ^a	9.22±0.22 ^{ab}
Ortalama	76.45±0.38 ¹	3.14±0.22 ¹	9.16±0.31 ¹	8.93±0.11 ¹²
C1 (%3 Gliserol- 0 mg/ml)	77.0±0.71 ^{abc}	5.83±0.09 ^a	11.47±0.63 ^a	14.24±0.28 ^{bc}
C2 (%3 Gliserol- 0.5 mg/ml)	76.2±0.69 ^{abcd}	5.96±0.11 ^a	12.00±0.14 ^a	14.04±0.24 ^{bc}
C3 (%3 Gliserol- 1 mg/ml)	74.8±0.71 ^{abcd}	5.77±0.07 ^a	11.91±0.12 ^a	13.80±0.19 ^{bc}
C4 (%3 Gliserol- 2 mg/ml)	71.8±0.62 ^{bcd}	6.22±0.09 ^a	12.50±0.20 ^a	14.38±0.26 ^{bc}
Ortalama	74.95±0.37 ¹	5.94±0.33 ¹	11.97±0.18 ¹	14.12±0.12 ²³
D1 (%5 Gliserol- 0 mg/ml)	74.2±0.81 ^{abcd}	13.51±0.24 ^b	19.60±0.38 ^b	15.02±0.28 ^c
D2 (%5 Gliserol- 0.5 mg/ml)	75.4±0.71 ^{abcd}	13.56±0.17 ^b	19.56±0.25 ^b	14.74±0.25 ^c
D3 (%5 Gliserol- 1 mg/ml)	72.6±0.69 ^{abcd}	12.90±0.18 ^b	19.02±0.23 ^b	14.64±0.22 ^c
D4 (%5 Gliserol- 2 mg/ml)	70.4±0.70 ^{cd}	14.04±0.12 ^b	20.08±0.35 ^b	16.58±0.28 ^c
Ortalama	73.15±0.39 ¹	13.50±0.11 ²	19.57±0.17 ²	15.25±0.18 ²³
E1 (%7 Gliserol- 0 mg/ml)	72.6±0.89 ^{abcd}	16.04±0.37 ^b	23.90±0.43 ^b	16.58±0.29 ^c
E2 (%7 Gliserol- 0.5 mg/ml)	73.2±0.78 ^{abcd}	16.08±0.39 ^b	23.92±0.49 ^b	15.94±0.18 ^c
E3 (%7 Gliserol- 1 mg/ml)	74.2±0.71 ^{abcd}	15.60±0.35 ^b	23.24±0.43 ^b	15.74±0.16 ^c
E4 (%7 Gliserol- 2 mg/ml)	69.4±0.78 ^d	16.58±0.38 ^b	24.80±0.47 ^b	16.30±0.24 ^c
Ortalama	72.35±0.41 ¹	16.08±0.19 ²	23.97±0.24 ²	16.14±0.12 ³

a,b,c,d : Aynı sütunda değişik harfler taşıyan ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0.05).

1,2,3 : Aynı sütunda değişik sayılar taşıyan ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0.05).

Tablo 6’da görüldüğü üzere, farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarının gliserolasyon ve equilibrasyon sonucu motilite değerleri gliserol oranı arttıkça azalmıştır. Gliserol oranı belli bir oranda iken vitamin C miktarının artışına bağlı olarak motilite de bariz bir değişme olmamıştır. Gliserol ve vitamin C içermeyen A1 kontrol grubunda motilite %79.0±0.77 olarak en yüksek düzeyde bulunurken, %7 gliserol ve 2 mg/ml Vitamin C içeren E4 grubunda %69.4±0.78’lik olarak en düşük düzeyde bulunmuştur. En az gliserol (%1) ve en az vitamin C (0.5 mg/ml) ilave edilen B2 grubu spermada, aynı maddelerin daha fazla ilave edildiği diğer gruplara göre en fazla motilite (%77.6±0.67) elde edilmiştir. Sperma grupları arasında motilite değerleri yönünden yapılan istatistiki analizde C4, D4 ve E4 gruplarında A1 kontrol grubuna göre önemli derecede (P<0.05) bir azalma görülmüştür.

Tablo 6'dan takip edilebileceği gibi farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarında gliserolasyon ve equilibasyon sonucu akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı ve toplam anormal spermatozoon oranı gliserol oranının artışına bağlı olarak artmıştır. Ancak gliserol oranı belli bir düzeyde iken vitamin C'nin artışına bağlı olarak akrozomal bozukluklarda ve toplam anormal spermatozoon oranında önemli bir değişiklik olmamıştır ($P>0.05$). Kontrol grubunda (A1) akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı $\%2.90\pm0.04$ ve toplam anormal spermatozoon oranı $\%8.98\pm0.06$ iken aynı değerler gliserol katılmış gruplar arasında en düşük oranda $\%1$ gliserol ve 1 mg/ml Vitamin C içeren B3 grubunda sırasıyla $\%3.01\pm0.05$ ve $\%9.11\pm0.06$ bulunmuş ve $\%7$ gliserol ve 2 mg/ml Vitamin C içeren E4 grubunda ise yine sırasıyla $\%16.58\pm0.38$ ve $\%24.80\pm0.47$ olarak en fazla tespit edilmiştir. Bu gruplar arasında yapılan istatistiki analizde $\%5$ ve $\%7$ gliserol içeren tüm gruplarda akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranları ve toplam anormal spermatozoon oranları kontrol grubuna göre önemli bir artış ($P<0.05$) göstermiştir.

Farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış 20 grup spermanın gliserolasyon ve equilibasyon sonucu elde edilen ölü spermatozoon oranları Tablo 6'da gösterilmiştir. Buradan anlaşıldığı üzere gliserol oranı arttıkça ölü spermatozoon oranı artmış ama gliserol oranının aynı olduğu gruplarda, vitamin C'nin artışına bağlı olarak bariz bir değişme olmamıştır. Ölü spermatozoon oranı A1 kontrol grubunda en düşük ($\%6.62\pm0.16$) ve $\%7$ gliserol ve 0 mg/ml vitamin C içeren E1 grubunda da en yüksek ($\%16.58\pm0.29$) bulunmuştur. Gruplar arasında yapılan istatistiki analizde kontrol grubu ile $\%3$, $\%5$ ve $\%7$ gliserol içeren gruplar arasında ölü spermatozoon oranı artışı yönünden fark önemli ($P<0.05$) olmuştur.

5.5.3. Dondurulup Çözdürülmüş Spermalardaki Spermatolojik Özellikler

Değişik oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış 20 farklı grup spermanın dondurulup çözdürülmesi sonucu tespit edilen spermatolojik özellikler Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7'den izlenebileceği gibi farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırıldıktan sonra dondurulup çözdürülmüş sperma gruplarına ait motilite değerleri gliserol oranı artışına bağlı olarak artmış ancak gliserol oranının

aynı olduğu gruplarda vitamin C'nin artışına bağlı olarak bariz bir değişme olmamıştır. Motilite gliserol oranının sıfır olduğu **A1-A4** gruplarında ortalama 1.20 ± 0.15 , gliserol oranının %1 olduğu **B1-B4** gruplarında ortalama 15.48 ± 0.41 , gliserol oranının %3 olduğu **C1-C4** gruplarında ortalama 33.50 ± 0.67 , gliserol oranının %5 olduğu **D1-D4** gruplarında ortalama 49.55 ± 0.40 ve gliserol oranının %7 olduğu **E1-E4** gruplarında da ortalama 43.70 ± 0.43 olmuştur. Dondurulup çözödürölen spermalarda, farklı oranlarda gliserol içeren grupların motilite değeri arasında istatistiki yönden önemli farklılıklar ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Tablo 7. Farklı Oranlarda Gliserol ve Vitamin C İçeren Sulandırıcılarla Sulandırılmış Spermaların Dondurulup Çözödürölməsi Sonucu Tespit Edilen Spermatolojik Özellikler (n=10)

Gruplar (Gliserol - Vitamin C)	Motilite (%)	Akrozoma Bağılı Anormal Spt. Oranı (%)	Toplam Anormal Spt.Oranı (%)	Ölü Spt. Oranı (%)
A1 (%0 Gliserol- 0 mg/ml)	1.3 ± 0.31^a	14.41 ± 0.61^a	21.12 ± 0.70^a	97.20 ± 0.39^a
A2 (%0 Gliserol 0.5 mg/ml)	1.0 ± 0.29^a	14.02 ± 0.54^a	22.78 ± 0.57^a	97.48 ± 0.30^a
A3 (%0 Gliserol- 1 mg/ml)	1.5 ± 0.33^a	12.40 ± 0.52^a	20.22 ± 0.58^a	97.00 ± 0.40^a
A4 (%0 Gliserol- 2 mg/ml)	1.0 ± 0.29^a	16.14 ± 0.43^a	24.28 ± 0.50^a	97.64 ± 0.24^a
Ortalama	1.20 ± 0.15^1	14.24 ± 0.33^1	22.10 ± 0.38^1	97.33 ± 0.17^1
B1 (%1 Gliserol- 0 mg/ml)	15.1 ± 0.83^b	18.14 ± 0.43^a	27.14 ± 0.49^{abc}	81.32 ± 0.68^b
B2 (%1 Gliserol- 0.5 mg/ml)	15.6 ± 0.80^b	17.34 ± 0.52^a	26.30 ± 0.47^{ab}	81.93 ± 0.56^b
B3 (%1 Gliserol- 1 mg/ml)	17.0 ± 0.81^b	16.98 ± 0.43^a	25.56 ± 0.47^a	80.72 ± 0.52^b
B4 (%1 Gliserol- 2 mg/ml)	14.2 ± 0.79^b	18.60 ± 0.44^a	27.80 ± 0.45^{abc}	83.04 ± 0.36^b
Ortalama	15.48 ± 0.41^2	17.77 ± 0.24^1	26.70 ± 0.26^1	81.75 ± 0.29^2
C1 (%3 Gliserol- 0 mg/ml)	33.0 ± 1.41^c	29.10 ± 0.50^b	35.70 ± 1.54^d	60.45 ± 0.60^c
C2 (%3 Gliserol- 0.5 mg/ml)	34.0 ± 1.34^c	30.02 ± 0.69^b	34.60 ± 0.77^{cd}	59.96 ± 0.52^c
C3 (%3 Gliserol- 1 mg/ml)	35.4 ± 1.28^c	28.58 ± 0.48^b	33.32 ± 0.68^{bcd}	58.84 ± 0.42^c
C4 (%3 Gliserol- 2 mg/ml)	31.6 ± 1.29^c	31.00 ± 0.60^{bcd}	36.82 ± 0.99^d	61.10 ± 0.49^c
Ortalama	33.50 ± 0.67^3	29.68 ± 0.31^2	35.11 ± 0.55^2	60.09 ± 0.28^3
D1 (%5 Gliserol- 0 mg/ml)	50.2 ± 0.78^{de}	33.12 ± 0.52^{bcd}	38.70 ± 0.93^d	40.80 ± 0.69^{de}
D2 (%5 Gliserol- 0.5 mg/ml)	49.2 ± 0.75^{def}	31.54 ± 0.71^{bcd}	36.66 ± 0.79^d	40.06 ± 0.72^{de}
D3 (%5 Gliserol- 1 mg/ml)	51.4 ± 0.70^d	31.00 ± 0.54^{bcd}	35.75 ± 0.69^d	38.60 ± 0.49^d
D4 (%5 Gliserol- 2 mg/ml)	47.4 ± 0.85^{def}	32.29 ± 0.61^{bcd}	38.06 ± 0.99^d	40.32 ± 0.53^{de}
Ortalama	49.55 ± 0.40^4	31.99 ± 0.32^2	37.29 ± 0.45^2	39.95 ± 0.31^4
E1 (%7 Gliserol- 0 mg/ml)	43.8 ± 0.85^{ef}	40.16 ± 0.87^e	48.10 ± 0.73^e	44.63 ± 0.87^{de}
E2 (%7 Gliserol- 0,5 mg/ml)	42.8 ± 0.86^f	38.57 ± 0.93^{de}	46.98 ± 0.94^e	45.62 ± 0.77^{de}
E3 (%7 Gliserol- 1 mg/ml)	44.6 ± 0.91^{def}	37.56 ± 0.92^{cde}	44.84 ± 0.97^e	46.58 ± 0.61^e
E4 (%7 Gliserol- 2 mg/ml)	43.6 ± 0.85^{ef}	42.72 ± 1.33^e	49.90 ± 1.36^e	47.72 ± 0.57^e
Ortalama	43.70 ± 0.43^4	39.75 ± 0.59^3	47.46 ± 0.57^3	46.14 ± 0.39^4

a,b,c,d,e,f : Aynı sütunda değışik harfler taşıyan ortalama değeri arasındaki farklılar önemlidir ($P < 0.05$).

1,2,3,4 : Aynı sütunda değışik sayılar taşıyan ortalama değeri arasındaki farklılar önemlidir ($P < 0.05$).

Spermaların dondurulup ve çözödürölməsi sonucu akrozoma bağılı anormal spermatozoon oranları gliserol oranının artışına bağılı olarak artmıştır. Aynı oranda

gliserol içeren gruplarda vitamin C miktarının artışına bağlı olarak bariz bir değişme olmamıştır. Akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı gliserol oranı sıfır olan **A1-A4** gruplarında ortalama 14.24 ± 0.33 , gliserol oranı %1 olan **B1-B4** gruplarında ortalama 17.77 ± 0.24 , gliserol oranı %3 olan **C1-C4** gruplarında ortalama 29.68 ± 0.31 , gliserol oranı %5 olan **D1-D4** gruplarında ortalama 31.99 ± 0.32 ve gliserol oranı %7 olan **E1-E4** gruplarında da ortalama 39.75 ± 0.59 olmuştur.

Spermaların dondurulup çözündürülmesi sonucu toplam anormal spermatozoon oranları gliserol oranının artışına bağlı olarak artmıştır. Aynı oranda gliserol içeren gruplarda vitamin C miktarının artışına bağlı olarak önemli bir değişme olmamıştır. Toplam anormal spermatozoon oranı gliserol oranı sıfır olan **A1-A4** gruplarında ortalama 22.10 ± 0.38 , gliserol oranı %1 olan **B1-B4** gruplarında ortalama 26.70 ± 0.26 , gliserol oranı %3 olan **C1-C4** gruplarında ortalama 35.11 ± 0.55 , gliserol oranı %5 olan **D1-D4** gruplarında ortalama 37.29 ± 0.45 ve gliserol oranı %7 olan **E1-E4** gruplarında da ortalama 47.46 ± 0.57 olmuştur.

Akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı ve toplam anormal spermatozoon oranı yönünden sperma grupları arasında yapılan istatistiki analizde kontrol grubu ile %1 gliserol içeren gruplar arasında benzerlik bulunurken kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Dondurulup çözündürülme sonucu ölü spermatozoon oranları en fazla 97.64 ± 0.24 olarak sulandırıcıya gliserol katılmadığı zaman tespit edilmiş ve gliserol oranının artışına bağlı olarak azalmıştır. Gliserol oranının aynı kaldığı gruplarda vitamin C miktarının artışına bağlı olarak ölü spermatozoon oranında farkedilir bir değişme olmamıştır. Ölü spermatozoon oranı gliserol oranı %1 olan **B1-B4** gruplarında ortalama 81.75 ± 0.29 , gliserol oranı %3 olan **C1-C4** gruplarında ortalama 60.09 ± 0.28 , gliserol oranı %5 olan **D1-D4** gruplarında ortalama 39.95 ± 0.31 ve gliserol oranı %7 olan **E1-E4** gruplarında da ortalama 46.14 ± 0.39 olarak hesaplanmıştır.

Dondurulup çözündürülen spermalarda, farklı oranlarda gliserol içeren gruplar arasında ölü spermatozoon oranları yönünden yapılan istatistiki analiz sonucunda gliserol oranının artışına bağlı olarak önemli farklılıklar bulunurken ($P < 0.05$) %5 ve %7 gliserol içeren gruplarda diğer gruplara göre önemli derecede azalma olduğu hesaplanmıştır.

6. TARTIŞMA

Hayvan ıslahı açısından suni tohumlama uygulamalarında dondurulup çözdürülmüş koç spermasının kullanılması bir çok yönden büyük önem taşımaktadır. Ancak bir çok araştırmacı (1, 49, 90, 128) bu spermalarla yapılan tohumlamalar sonucunda taze spermalarla yapılan tohumlamalara göre daha düşük oranda fertilitte elde ettiklerini ve bu düşük fertilitte sonuçlarının da spermanın sulandırılması ve dondurulması işlemleri esnasında meydana gelen motilitedeki azalmaya ve akrozomal bozukluklara bağlı olabileceğini bildirmektedirler.

Sunulan çalışmada kan serumundaki ortalama vitamin C düzeyi koçlara vitamin C enjeksiyonlarından önce 0.427 ± 0.01 mg/100 ml ve vitamin C enjeksiyonlarından sonra 1.596 ± 0.03 mg/100 ml olarak tespit edilmiş ve bu iki değer arasındaki fark önemli ($P < 0.01$) bulunmuştur. Yapılan değerlendirmede vitamin C enjeksiyonlarının kan serumundaki vitamin C düzeyini artırdığı tespit edilmiştir.

Vitamin C enjeksiyonları uygulanmadan önce koçlardan elde edilen kan serumu vitamin C düzeyleri, Başpınar ve ark. (16)'larının 0.38 ± 0.05 - 0.90 ± 0.05 mg/100 ml ve Robinson ve ark. (108)'lerinin 0.48 mg/100 ml olarak bildirdikleri ortalama kan serumu vitamin C düzeylerine yakın bulunurken, Çamaş ve ark. (33)'lerinin 0.78 mg/100 ml, Haag ve ark. (61)'lerinin 0.91 ± 0.02 mg/100 ml, Kolb ve ark. (80)'lerinin 0.80-1.40 mg/100 ml ve Altıntaş ve ark. (9)'lerinin 1.30 mg/100 ml olarak bildirdikleri ortalama kan serumu vitamin C düzeylerinden ise düşük bulunmuştur.

Kan serumu vitamin C düzeyleri arasındaki bu farklılıklar, çalışmalarda kullanılan hayvanların büyük ölçüde aldıkları yemlere, ırklarına, cinsiyetlerine, yaşlarına, mevsimlere ve vitamin C tayin metoduna bağlı olabilir.

Vitamin C enjeksiyonları uygulandıktan sonra koçlardan elde edilen kan serumu vitamin C düzeyleri ise, Black ve ark (22)'lerinin vitamin C enjeksiyonları sonrası 7 saatte 0.86 mg/100 ml olarak bildirdikleri ortalama kan serumu vitamin C düzeyinden yüksek bulunmuştur. Bu farklılık araştırmacının kullandığı hayvanların ırkına, yaşına ve beslenme şekline bağlı olabileceği gibi vitamin C enjeksiyonları sonrası kanların alınma saatine ve vitamin C tayin metoduna bağlı olabilir.

Black ve ark. (22)'ları koçlara vitamin C enjeksiyonlarının intramusküler olarak uygulanmasının kan serumu vitamin C düzeyini artırdığını ve intravenöz uygulamalara göre vücutta daha fazla ve uzun süreli etki gösterdiğini bildirmiştir.

Kolb ve ark. (81)'ları ise yetişkin koyunlara vitamin C enjeksiyonları yapılmasının kan serumu vitamin C düzeyini yükselttiğini, 24 saatin sonunda ise bu değerlerin normale döndüğünü bildirmiştir.

Yapılan çalışmada spermadaki ortalama vitamin C düzeyi koçlara vitamin C enjeksiyonlarından önce 3.384 ± 0.08 mg/100 ml ve vitamin C enjeksiyonlarından sonra 3.915 ± 0.07 olarak tespit edilmiş ve bu iki değer arasındaki fark önemli ($P < 0.01$) bulunmuştur. Yapılan değerlendirmede vitamin C enjeksiyonlarından sonra kan serumu vitamin C düzeyi artışına paralel olarak sperma vitamin C düzeyinde de bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Koçlarda spermanın vitamin C düzeyine ilişkin bir literatüre rastlanmamıştır.

Sunulan çalışmada elde edilen ortalama sperma miktarı koçlara vitamin C enjeksiyonlarından önce 1.02 ± 0.02 ml ve vitamin C enjeksiyonlarından sonra 1.18 ± 0.02 ml olarak tespit edilmiş ve bu iki değer arasındaki fark önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Vitamin C enjeksiyonlarından önce koçlardan elde edilen ortalama sperma miktarı, Cameron (28)'un 0.98 ml, Aksoy ve ark. (6)'larının 1.01 ml, Gökçen ve ark. (56)'larının 1.0 ml, Soylu (129)'nun 1.03 ml ve Demirci (42)'nin 0.93 ml olarak bildirdikleri ortalama sperma miktarları değerlerine yakın bulunurken, Gündoğan ve Demirci (59)'nin 0.81 ml, Öztürkler ve ark. (100)'lerinin 0.8 ml ve Sinha ve Sahni (127)'nin 0.71 ml olarak bildirdikleri değerlerden yüksek, Artiga ve ark. (12)'lerinin 1.19 ml, Özkoca (99)'nın 1.19 ml ve Gülyüz ve Yıldız (58)'in 1.3 ml olarak bildirdikleri değerlerden ise düşük bulunmuştur.

Sperma miktarları arasındaki bu farklılıklar, araştırmalarda kullanılan koçların ırkına, yaşına, beslenme şekline, ejakülasyon sıklığına, seksüel prestimülasyona, sperma alma yöntemine ve mevsimlere bağlı olabilir.

Yapılan taramalarda vitamin C enjeksiyonlarından sonra koçlardan elde edilen ortalama sperma miktarına ilişkin bir literatüre rastlanmamıştır.

Bu çalışmada elde edilen ortalama kitle hareketi koçlara vitamin C enjeksiyonlarından önce 4.03 ± 0.03 ve vitamin C enjeksiyonlarından sonra 4.13 ± 0.03 olarak tespit edilmiş ve bu iki değer birbirine yakın ($P > 0.05$) bulunmuştur.

Bu değerler, Ataman (14)'ın 4.16 olarak bildirdiği ortalama kitle hareketi değerine yakın bulunurken, Cameron (28)'un 3.10 ve Gökçen ve ark. (56)'nın 3.5 olarak bildirdikleri kitle hareketi değerlerinden yüksek, Gündoğan ve Demirci

(59)'nin 4.36 ve Öztürkler ve ark. (100)'larının 4.5 olarak bildirdikleri kitle hareketi değerinden ise düşük bulunmuştur.

Spermalara ait ortalama kitle hareketleri arasındaki bu farklılıklar materyal olarak kullanılan hayvanların ırkına, yaşına, sperma alınan mevsime, sperma alma yöntemine, muayene tekniğine ve muayene yapan kişinin şahsi değerlendirmesine bağlı olabilir.

Sunulan bu çalışmada elde edilen ortalama motilite değerleri koçlara vitamin C enjeksiyonlarından önce 80.7 ± 0.31 ve vitamin C enjeksiyonlarından sonra 82.2 ± 0.24 olarak tespit edilmiş ve bu iki değer birbirine yakın ($P > 0.05$) bulunmuştur.

Bu motilite değerleri, Tekin ve Günzel (136)'in % 82.3, Tümen ve Özkoca (140)'nın %80, Öztürkler ve ark. (100)'larının %80.3 ve Gündoğan ve Demirci (59)'nin %79.9 olarak bildirdikleri ortalama motilite değerlerine yakın bulunurken, Cameron (28)'un %73.6, Aksoy ve ark. (6)'larının %65.7, Gür ve Tatlı (60)'nın %69.6 ve Demirci (42)'nin %72.6 olarak belirledikleri motilite oranlarından yüksek, Soylu (129)'nun %89.3, Özkoca (99)'nin %90 ve Gülyüz ve Yıldız (58)'in %90 olarak belirledikleri motilite değerlerinden ise düşük bulunmuştur.

Sperma motilite değerleri arasındaki bu farklılıklar araştırmalarda kullanılan koçların ırkına, yaşına, sperma alınan mevsime, muayene yapan kişinin şahsi değerlendirmesine, muayene esnasındaki sıcaklığa, muayene tekniğine ve muayene esnasında kullanılan sulandırıcılara bağlı olabilir.

Yapılan çalışmada elde edilen ortalama spermatozoon yoğunluğu koçlara vitamin C enjeksiyonlarından önce $2.677 \pm 0.055 \times 10^9/\text{ml}$ ve vitamin C enjeksiyonlarından sonra $3.027 \pm 0.040 \times 10^9/\text{ml}$ olarak tespit edilmiş ve bu iki değer arasındaki fark önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Vitamin C enjeksiyonları uygulanmadan önce koçlardan elde edilen ortalama spermatozoon yoğunluğu, Özkoca (99)'nin $2.492 \times 10^9/\text{ml}$, Öztürkler ve ark. (100)'larının $2.400 \times 10^9/\text{ml}$, Aksoy ve ark. (7)'lerinin $2.680 \times 10^9/\text{ml}$ ve Sinha ve Sahni (127)'nin $2.700 \times 10^9/\text{ml}$ olarak bildirdiği ortalama spermatozoon yoğunluğuna yakın bulunurken, Cameron (28)'un $1.330 \times 10^9/\text{ml}$ olarak bildirdiği değerden yüksek, Soylu (129)'nun $2.960 \times 10^9/\text{ml}$, Aksoy ve ark. (6)'larının $3.040 \times 10^9/\text{ml}$, Gökçen ve ark. (56)'lerinin $3.100 \times 10^9/\text{ml}$, Gülyüz ve ark. (58) $3.300 \times 10^9/\text{ml}$, Gündoğan ve

Demirci (59)'nin $3.620 \times 10^9/\text{ml}$, Saleh (115)'in $4.387 \times 10^9/\text{ml}$ ve Artiga ve ark. (12)'lerinin $5.400 \times 10^9/\text{ml}$ olarak bildirdikleri değerlerden ise düşük bulunmuştur.

Spermallerdeki spermatozoon yoğunlukları arasındaki bu farklılıklar, yoğunluğu tayin edenin kişiliğine, kullanılan metoda, araştırmalarda kullanılan hayvanların ırkına, yaşına, sperma alma yöntemine, koçların beslenme şekline, sperma alma sıklığına ve mevsimlere bağlı olabilir.

Yapılan taramalarda vitamin C enjeksiyonlarından sonra koçlardan elde edilen ortalama spermatozoon yoğunluğuna ait bir literatüre rastlanmamıştır.

Bu çalışmada elde edilen ortalama ölü spermatozoon oranları koçlara vitamin C enjeksiyonlarından önce 9.66 ± 0.26 ve vitamin C enjeksiyonlarından sonra 8.72 ± 0.17 olarak tespit edilmiş ve bu iki değer birbirine yakın ($P > 0.05$) bulunmuştur.

Bu değerler, Aksoy ve ark. (7)'lerinin 6.67 , Ataman (14)'in $3.4-8$ ve Gökçen ve ark. (56)'lerinin 8.4 olarak bildirdiği ortalama ölü spermatozoon oranına yakın bulunurken, Tümen ve Özkoca (140)'nın 17.4 ve Öztürkler ve ark. (100)'lerinin 22.5 olarak belirledikleri değerlerden düşük bulunmuştur.

Ölü spermatozoon oranları arasındaki bu farklılıklar, muayeneyi yapanın kişiliğine, çalışmalarda kullanılan hayvanların ırkına, yaşına, beslenme şekline ve mevsime bağlı olabilir.

Sunulan çalışmada elde edilen ortalama akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranları koçlara vitamin C enjeksiyonlarından önce 2.13 ± 0.06 ve vitamin C enjeksiyonlarından sonra 2.05 ± 0.05 olarak tespit edilmiş ve bu iki değer birbirine yakın ($P > 0.05$) bulunmuştur.

Bu değerler, Tümen ve Özkoca (140)'nın 2.1 olarak bildirdiği ortalama akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranına yakın bulunurken, Tekin ve Günzel (136)'in 4.7 ve Öztürkler ve ark. (100)'lerinin 5.8 olarak belirledikleri değerlerden düşük bulunmuştur.

Spermadaki akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranları arasındaki bu farklılıklar, materyal olarak kullanılan koçların ırkına, yaşına ve beslenme şekline bağlı olabilir.

Bu çalışmadan elde edilen ortalama toplam anormal spermatozoon oranı koçlara vitamin C enjeksiyonlarından önce 8.71 ± 0.19 ve vitamin C

enjeksiyonlarından sonra 8.46 ± 0.19 olarak tespit edilmiş ve bu iki değer birbirine yakın ($P > 0.05$) bulunmuştur.

Bu değerler, Aksoy ve ark. (6)'larının 7.19 , Gökçen ve ark (56) 7.18 ve Soylu (129)'nun 7.18 olarak bildirdiği ortalama anormal spermatozoon oranlarına yakın bulunurken, Gür ve Tatlı (60)'nın 12.19 , Öztürkler ve ark. (100)'larının 14.4 ve Özkoca (99)'nin 14.9 olarak bildirdiği değerlerden düşük, Gündoğan ve Demirci (59)'nin 3.63 , Tümen ve Özkoca (140)'nin 4.2 ve Gülyüz ve Yıldız (58)'in 5.75 olarak bildirdikleri değerlerden ise yüksek bulunmuştur.

Anormal spermatozoon oranları arasındaki bu farklılıklar, kullanılan sperma sulandırıcılarına, sulandırıcının sıcaklığına, araştırmalarda kullanılan hayvanların ırkına, yaşına, beslenme şekline, sperma alma sıklığına ve mevsimlere bağlı olabilir.

Spermaların ortalama pH değerleri koçlara Vitamin C enjeksiyonlarından önce 6.86 ± 0.04 ve Vitamin C enjeksiyonları uygulandıktan sonra 6.78 ± 0.03 olarak tespit edilmiş ve bu iki değer birbirine yakın ($P > 0.05$) bulunmuştur.

Bu değerler, Gündoğan ve Demirci (59)'nin 6.59 , Gökçen ve ark. (56)'larının 6.8 ve Gülyüz ve Yıldız (58)'in 6.95 olarak bildirdiği ortalama pH değerleriyle paralellik arz etmektedir.

Sunulan çalışmada intramusküler vitamin C uygulamalarından sonra kan serumu ve sperma vitamin C düzeylerinin arttığı ve bu hayvanlardan alınan sperma örneklerinde hacim ve yoğunluk yönünden önemli derecede bir artış olduğu tespit edilmiş, ancak motilite ve diğer spermatolojik özelliklerin değişmediği gözlenmiştir. Bu bulgular çoğu araştırmacılar (29, 39, 97, 103) tarafından da teyit edilmektedir.

Bu çalışmada koçlara intramusculer vitamin C uygulanmasından sonra sperma hacminin ve yoğunluğunun artması, kimi araştırmacıların (21, 35, 44, 64, 68) belirttiği gibi askorbik asitin metabolik ve çevresel stresi azaltması ve plazma LH ve testesteron seviyesini artırması sonucu spermatogenezisi ve ek salgı bezlerini stimüle etmesine bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir.

Sunulan çalışmada ön sulandırılması yapıp sıcaklığı $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye düşürüldükten sonra 8 eşit kısma bölünen ve sırasıyla 0 mg/ml (kontrol), 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 ve 10.0 mg/ml miktarında vitamin C ilave edilen spermaların motilite ve pH değerleri 24 saat boyunca çeşitli aralıklarla tespit edilmiştir.

Araştırmada kontrol grubu ile 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/ml vitamin C ilave edilen gruplar için 0. saatteki motilite değerleri 82.4 ile 78.0 arasında değişmekte

olup bu gruplar arasında istatistiki olarak bir fark bulunmazken ($P>0.05$), 5 mg/ml vitamin C ilave edilen grupta motilite değeri %39.2 olup kontrol grubuna göre azalmış ($P<0.01$) ve 10 mg/ml vitamin C ilave edilen grupta ise % 0 olmuştur ($P<0.01$). Sonraki 2., 4. ve 8. saatlerde kontrol grubu ile 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/ml vitamin C ilave edilen gruplar arasında motilite değerleri yönünden önemli bir farklılık görülmezken ($P>0.05$), 5 mg/ml vitamin C ilave edilen grupta motilite değeri 8. saatte %4.8 olmuş ve kontrol grubuna göre önemli derecede azalmıştır ($P<0.01$). Çalışmanın 16. ve 24. saatlerinde ise 0.1, 0.2, 0.5 ve 1 mg/ml vitamin C ilave edilen gruplar ile kontrol grubuna ait motilite değerleri %77.6 ile %70.0 arasında değişmiş olup bu gruplar arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Aynı saatte 2 mg/ml vitamin C ilave edilen grupta motilite değeri %69.6 ile %68.4 arasında olup kontrol grubuna göre azalmış ($P<0.05$) ve 5 mg/ml vitamin C ilave edilen grupta ise motilite %0'a düşmüştür ($P<0.01$).

Araştırmada kontrol grubu ile 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/ml vitamin C ilave edilen gruplar için 0. saatte pH değerleri 6.9 ile 6.5 arasında olup bu gruplar arasında istatistiki yönden önemli bir fark bulunmazken ($P>0.05$), 5 ve 10 mg/ml vitamin C ilave edilen gruplarda pH değerleri sırasıyla 5.9 ve 5.3 olup kontrol grubuna göre azalmıştır ($P<0.05$). Sonraki 2., 4., 8. ve 16. saatlerde kontrol grubu ile 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/ml vitamin C ilave edilen grupların pH değerleri arasında önemli bir farklılık görülmezken ($P>0.05$), 5 ve 10 mg/ml vitamin C ilave edilen gruplardaki pH değeri düşüklüğünü sürdürmüştür ($P<0.05$). Çalışmanın 24. saatinde ise 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/ml vitamin C ilave edilen gruplar ile kontrol grubuna ait pH değerleri 6.8 ile 6.3 arasında olup bu gruplar arasında önemli bir fark bulunmazken ($P>0.05$), 5 ve 10 mg/ml vitamin C ilave edilen gruplarda pH değerleri sırasıyla 5.7 ve 5.1 olmuş ve kontrol grubuna göre önemli derecede azalmıştır ($P<0.05$).

Spermanın, sıcaklığı 4°C'ye düşürülerek saklanması esnasında sperma sulandırıcılarına 2 mg/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarda vitamin C ilave edilmesinin, spermanın pH değerlerini düşürdüğü ve spermatozoon motilitesini önemli derecede baskıladığı tespit edilmiştir.

Hafez (62), koç spermasının pH'sının 5.9-7.3 arasında değiştiğini ve spermatozoonların bu aralıktaki pH değişimlerine belirli derecede tolerans gösterebileceğini bildirmiştir. Ayrıca spermanın sıcaklığının 5°C'ye düşürülmesinin spermatozoonların metabolizma faaliyetlerini yavaşlattığını ancak tam olarak

durdurmadığını, spermanın bu sıcaklıkta bekletilmesi esnasında fruktozun metabolize olmasıyla açığa çıkan laktik asit ve çeşitli metabolizma artıklarının spermanın pH'sını düşürdüğünü ve bu durumun spermatozoonlar üzerinde toksik etki gösterdiğini belirtmiştir.

Daunter ve ark. (37)'ları insan spermasında vitamin C seviyesindeki yükselmenin spermatozoon motilitesinde bir azalmaya yol açtığını bildirirken, Acott ve Carr (3), spermanın pH değerindeki düşmenin motil spermatozoon oranını azalttığını bildirmiştir.

Salisbury ve ark. (116), spermatozoon motilitesinin yüksek kalması ve içerilerinde bulunan bazı enzimlerin aktivitelerini sürdürebilmeleri için belli bir pH değerine ihtiyaç duyulduğunu, ortamın pH'sındaki değişmelerin spermatozoonların motilitesi ve yaşama kabiliyetleri üzerine olumsuz bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Aurich ve ark. (15) sulandırılmış aygır spermasına 0.45-0.90 g/lt vitamin C ilave edilmesinin spermanın 5°C'de saklanması esnasında kontrol grubuna göre motiliteyi ve membran yapısı sağlam olan spermatozoon oranını artırdığını, bunun vitamin C'nin spermadaki reaktif oksijen türlerinin (ROS) oranını azaltmasına ve membran lipidlerinin peroksidasyona uğrayışını önlemesine bağlı olabileceğini, ancak 0.90 g/lt'nin üzerindeki konsantrasyonların ise motilite oranını azalttığını, bunun da pH'daki düşmeye bağlı olabileceğini ileri sürmektedirler.

Bu çalışma sonuçlarına bakıldığında da 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2mg/ml oranında spermaya katılan vitamin C'nin spermatozoon motilitesini ekilemezken, 5 ve 10 mg/ml'lik konsantrasyonların motiliteyi önemli derecede düşürdüğü görülmüştür. Motilitedeki bu azalmanın başlıca sebebi vitamin C'nin, asidik özelliğinden dolayı sulandırılmış spermanın pH düzeyini düşürmesi ve dolayısıyla pH değerinin spermatozoonların pH değişimlerine karşı tolere edebildiği düzeyin altına düşmesi olabilir.

Sunulan çalışmada 37°C'de ön sulandırılması yapılan pooling'e ait ortalama motilite değeri 82.4 ± 0.84 iken sıcaklık 4°C'ye düşürüldüğünde aynı değer 81.4 ± 0.57 olarak bulunmuştur. Bu değerler Gökçen ve ark. (54)'larının %82, Tekin ve Günzel (136)'in %78.56, Öztürkler ve ark. (100)'larının %81 ve Bozkurt ve ark. (25)'lerinin %84.66 olarak bildirdikleri ortalama motilite değerlerine yakın bulunurken, Tümen ve Özkoca (140)'nın %89 ve Upreti ve ark. (142)'lerinin %89

olarak bildirdikleri motilite değerlerinden düşük, Fiser ve ark. (49)'larının %75.5 olarak bildirdikleri değerden ise yüksek olmuştur.

Çalışmada 37°C'de ön sulandırılması yapılan pooling'e ait ortalama akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı 2.54 ± 0.05 iken 4°C'ye soğutma sonucu 2.79 ± 0.03 olarak bulunmuştur. Bu değerler, Jones ve Mann (74)'in %2, Tümen ve Özkoca (140)'nın % 2.1-2.3 ve Gökçen ve ark (54)'lerinin %3.19 olarak bildirdikleri ortalama akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranına yakın bulunurken, Öztürkler ve ark. (100)'lerinin %5.1-6.1 ve Tasseron ve ark (135)'lerinin %8 olarak bildirdikleri değerlerden düşük bulunmuştur. Yine 37°C'de ön sulandırılması yapılan pooling'e ait ortalama toplam anormal spermatozoon oranı 8.65 ± 0.06 iken 4°C'ye soğutma sonucu 8.89 ± 0.05 olarak bulunmuştur. Bu değerler, Tümen ve Özkoca (140)'ın %4.3-5.5 olarak bildirdikleri ortalama akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranına yakın bulunurken, Öztürkler ve ark. (100)'lerinin %13.9-17.3 olarak bildirdikleri değerlerden düşük olmuştur.

Sunulan çalışmada 37°C'de ön sulandırılması yapılan pooling'e ait ortalama ölü spermatozoon oranı 6.26 ± 0.17 iken 4°C'ye soğutma sonrası aynı değer 6.38 ± 0.15 olarak bulunmuştur. Bu değerler, Tümen ve Özkoca (140)'nın %14-5.9 olarak bildirdikleri ortalama ölü spermatozoon oranından düşük bulunmuştur.

Araştırmada 37°C'de ön sulandırılması yapılan pooling'e ait ortalama pH değeri 6.90 ± 0.10 iken 4°C'ye soğutma sonrası bunun değişmediği görülmüştür.

Sunulan çalışmada bir kaptan toplanıp 37°C'de ön sulandırılması yapılan pooling'in soğutularak sıcaklığının 4°C'ye düşürülmesinin spermatolojik özellikler üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı, görülen kimi farklılıkların da çalışmalarda kullanılan koçların ırkına, yaşına, sperma alma yöntemine, beslenme şekline, mevsimlere, kullanılan sulandırıcılara, soğutma yöntemine ve muayeneyi yapanın kişiliğine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarında gliserolasyon ve equilibrasyon sonrası motilite değerleri gliserol oranının sıfır olduğu **A1-A4** gruplarında 77.2 ± 0.70 ile 79.0 ± 0.77 arasında, gliserol oranının %1 olduğu **B1-B4** gruplarında 74.0 ± 0.81 ile 77.8 ± 0.72 arasında, gliserol oranının %3 olduğu **C1-C4** gruplarında 71.8 ± 0.62 ile 77.0 ± 0.71 arasında, gliserol oranının %5 olduğu **D1-D4**

gruplarında 70.4 ± 0.70 ile 75.4 ± 0.71 arasında ve gliserol oranının %7 olduğu E1-E4 gruplarında da 69.4 ± 0.78 ile 74.2 ± 0.71 arasında tespit edilmiştir.

Sunulan çalışmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarının gliserolasyon ve equilibasyon sonucu gliserol oranı değişmeden Vitamin C miktarının artışına bağlı olarak motilite de bariz bir değişme olmazken, gliserol oranı arttığında motilite değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum gliserolün spermatozoonlar üzerinde toksik etki göstermesinden kaynaklanabilir.

Çalışma gruplarında tespit edilen gliserolasyon ve equilibasyon sonucu kontrol grubuna ait motilite değeri Abdulhakeam ve ark. (1)'lerinin, koç spermasını gliserol ilave etmeden Tes-Tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C 'de 4 saat equilibasyona bıraktıktan sonra elde ettiği %83'lük, Saez ve ark. (110)'lerinin gliserol katmadan aynı sulandırıcı ile 5°C 'de 2 saat equilibasyona bıraktıktan sonra elde ettiği %82.4'lük, Tümen ve Özkoca (140)'nın gliserol katmadan glikoz-fosfat sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C 'de 8 saat equilibasyona bıraktıktan sonra elde ettiği %77'lik ve Bozkurt ve ark. (25)'nin gliserol katmadan yumurta sarısı-sodyum sitrat-glikoz sulandırıcısı ile sulandırdıktan sonra 4°C 'de 24 saat equilibasyona maruz bırakmaları sonucu elde ettikleri %76.6'lık motilite değerlerine benzer bulunurken, Petruzzi ve ark. (102)'lerinin, koç spermasını gliserol katılmamış Tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C 'de 4 saat equilibasyona tabi tutması sonucu elde ettikleri %70.44'lük değerden ise yüksek bulunmuştur. Farklı oranlarda gliserol katılmış spermaların equilibasyon sonrası motilite değerleri ise Payne ve ark. (101)'lerinin %3 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C 'de 2 saat equilibasyona bırakmaları sonucu elde ettikleri %68'lik, Tekin ve Günzel (136)'in %5 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C 'de 2 saat equilibasyona tabi tuttukten sonra elde ettikleri %76.06'lık, Öztürkler ve ark. (100)'lerinin %5 ve %7 oranlarında gliserol kattıkları tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C 'de 2 saat equilibasyona maruz bıraktıktan sonra elde ettikleri sırasıyla %76.3 ve %73.3 'lük ve El Alamy ve Foote (45)'nin %7 oranında gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-sitrik asit-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C 'de 3 saat equilibasyona bıraktıktan sonra elde ettikleri %76.5 'lik motilite değerlerine benzer bulunurken, Gökçen ve ark. (54)'lerinin %5 gliserol katılmış sodyum sitrat-yumurta sarısı-glikoz

sulandırıcısı ile sulandırılıp 5°C'de 14 saat equilibasyona bıraktıktan sonra elde ettikleri %65.0'lık değerdan yüksek, Upreti ve ark. (142)'larının %3 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C'de 2 saat equilibasyona tabi tutmaları sonucu elde ettikleri %86'lık değerdan ise düşük bulunmuştur.

Gliserolasyon ve equilibasyon sonucu motilite değerdlerinde gözlenen bu değışiklikler kullanılan sulandırıcıların içeriğine, hayvanlar arasındaki ırk farklılıklarına, mevsimlere, değışik equilibasyon sürelerine, soğutma tekniklerine ve muayeneyi yapan kişinin şahsi değerdlendirmesine bağı olabılır.

Yapılan araştırmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarında gliserolasyon ve equilibasyon sonrası akrozoma bağı anormal spermatozoon oranları, gliserol oranının sıfır olduğı A1-A4 gruplarında 2.84 ± 0.03 ile 3.00 ± 0.04 arasında, gliserol oranının %1 olduğı B1-B4 gruplarında 3.01 ± 0.05 ile 3.34 ± 0.07 arasında, gliserol oranının %3 olduğı C1-C4 gruplarında 5.77 ± 0.07 ile 6.22 ± 0.09 arasında, gliserol oranının %5 olduğı D1-D4 gruplarında 12.90 ± 0.18 ile 14.04 ± 0.12 arasında ve gliserol oranının %7 olduğı E1-E4 gruplarında da 15.60 ± 0.35 ile 16.58 ± 0.38 arasında bulunmuştur.

Sunulan çalışmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarının gliserolasyon ve equilibasyon sonucu gliserol oranı değışmeden Vitamin C miktarının artışına bağı olarak akrozoma bağı anormal spermatozoon oranlarında bariz bir değışme olmazken gliserol oranının %3'ün üzerine çıkmasının anormal spermatozoon oranlarını önemli derecede ($P < 0.05$) artırdığı tespit edilmiştir. Gliserol oranının artışına bağı olarak akrozoma bağı anormal spermatozoon oranlarındaki artış, koç spermatozoonlarının membran yapılarının hassas olmasına ve gliserolün hücre içerisine girişı esnasında oluşan osmatik basınç değışikliklikleri ile oluşan permeabilite bozukluklarına bağı olabılır.

Çalışma gruplarında tespit edilen gliserolasyon ve equilibasyon sonucu gliserol ilave edilmemiş kontrol grubuna ait spermalardaki akrozoma bağı anormal spermatozoon oranları, Saez ve ark. (110)'larının koç spermasını gliserol katılmamış Tes-tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C'de 2 saat equilibasyona bırakması sonucu elde ettiğı % 6.6'lık ve Tümen ve Özkoca (140)'nın gliserol katmadan glikoz-fosfat sulandırıcısı kullanarak sulandırdıkları ve 5°C'de

8 saat equilibrasyon sonucu elde ettikleri %2.3'lük oranlara benzer bulunmuştur. Gliserolasyon ve equilibrasyon sonucu farklı oranlarda gliserol katılmış spermalara ait akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranları ise Gökçen ve ark. (55)'lerinin koç spermalarını %5 ve %7 oranlarında gliserol katılmış sodyum sitrat-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C'de 2 saat equilibrasyona bırakmaları sonrası elde ettikleri sırasıyla %15.5 ve %18.0'lik ve Tekin ve Günzel (136)'in %5 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C'de 2 saat equilibrasyona tabi tutmaları sonucu elde ettikleri %9.68'lik değerlere benzer bulunurken, Öztürkler ve ark. (100)'lerinin %5 ve %7 gliserol kattıkları tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C'de 2 saat equilibrasyona tabi tutmaları sonucu elde ettikleri sırasıyla 7.9 ± 3.91 ve 7.4 ± 3.34 'lük değerden yüksek, Tasseron ve ark. (135)'lerinin %5 oranında gliserol katılmış raffinose- sodyum sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C'de 5 saat equilibrasyona maruz bırakmaları sonucu elde ettikleri 33.6 ± 1.8 'lik değerden ise düşük bulunmuştur.

Gliserolasyon ve equilibrasyon sonrası akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranları arasında gözlenen bu farklılıklar kullanılan sulandırıcıların içeriğine, materyal olarak kullanılan hayvanlar arasındaki ırk farklılıklarına, değişik equilibrasyon sürelerine, sulandırıcının sıcaklığına, kullanılan soğutma tekniklerine ve muayeneyi yapan kişinin şahsi değerlendirmesine bağlı olabilir.

Yapılan araştırmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarında gliserolasyon ve equilibrasyon sonucu toplam anormal spermatozoon oranları gliserol oranının sıfır olduğu **A1-A4** gruplarında 8.96 ± 0.04 ile 9.10 ± 0.05 arasında, gliserol oranının %1 olduğu **B1-B4** gruplarında 9.11 ± 0.06 ile 9.28 ± 0.05 arasında, gliserol oranının %3 olduğu **C1-C4** gruplarında 11.47 ± 0.63 ile 12.50 ± 0.20 arasında, gliserol oranının %5 olduğu **D1-D4** gruplarında 19.02 ± 0.23 ile 20.08 ± 0.35 arasında ve gliserol oranının %7 olduğu **E1-E4** gruplarında da 23.24 ± 0.43 ile 24.80 ± 0.47 arasında bulunmuştur.

Sunulan çalışmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarının gliserolasyon ve equilibrasyon sonucunda gliserol oranı değişmeden vitamin C miktarının artmasına bağlı olarak toplam anormal spermatozoon oranlarında önemli bir değişiklik görülmezken, gliserol oranının artışına bağlı olarak özellikle %5 ve %7 olduğu bütün gruplarda

toplam anormal spermatozoon oranlarının önemli derecede ($p<0.05$) artırdığı tespit edilmiştir. Gliserol oranının artışına bağlı olarak toplam anormal spermatozoon oranını artması, koç spermatozoonlarının membran yapılarının hassas olmasına, gliserolün spermatozoonlar üzerine toksik etki göstermesine ve gliserolün hücre içerisine girişi esnasında oluşan osmotik basınç değişiklikleri ile oluşan permeabilite bozukluklarına bağlı olabilir.

Çalışma gruplarında tespit edilen gliserolasyon ve equilibrasyon sonucu gliserol ilave edilmemiş kontrol grubuna ait toplam anormal spermatozoon oranları, Tümen ve Özkoca (140)'nın gliserol katmadan glikoz-fosfat sulandırıcısı kullanarak sulandırdıkları ve 5°C 'de 8 saat equilibrasyona bırakmaları sonucu elde ettikleri %5.5'lik orana benzer bulunmuştur. Farklı oranlarda gliserol katılmış spermaların gliserolasyon ve equilibrasyon sonucu toplam anormal spermatozoon oranları da Öztürkler ve ark. (100)'lerinin %5 ve %7 oranında gliserol kattıkları tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 5°C 'de 2 saat equilibrasyona tabi tutmaları sonucu elde ettikleri sırasıyla %14.5 ve %20.3'lük oranlara benzer bulunmuştur.

Yapılan araştırmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarında, gliserolasyon ve equilibrasyon sonucu ölü spermatozoon oranları, gliserol oranının sıfır olduğu **A1-A4** gruplarında %6.62 $\pm$ 0.16 ile %7.08 $\pm$ 0.16 arasında, gliserol oranının %1 olduğu **B1-B4** gruplarında %8.70 $\pm$ 0.23 ile %9.22 $\pm$ 0.22 arasında, gliserol oranının %3 olduğu **C1-C4** gruplarında %13.80 $\pm$ 0.19 ile %14.38 $\pm$ 0.26 arasında, gliserol oranının %5 olduğu **D1-D4** gruplarında %14.64 $\pm$ 0.22 ile %16.58 $\pm$ 0.28 arasında ve gliserol oranının %7 olduğu **E1-E4** gruplarında da %15.74 $\pm$ 0.16 ile %16.58 $\pm$ 0.29 arasında değişmiştir.

Sunulan çalışmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarının gliserolasyon ve equilibrasyon sonucunda gliserol oranı değişmeden Vitamin C miktarının artmasına bağlı olarak ölü spermatozoon oranlarında önemli bir değişiklik görülmezken gliserol oranının artışına bağlı olarak ölü spermatozoon oranlarının önemli derecede ($P<0.05$) artırdığı tespit edilmiştir. Ölü spermatozoon oranındaki bu artış, gliserolün spermatozoonlar üzerine toksik etkisinden kaynaklanabilir.

Çalışma gruplarında tespit edilen gliserolasyon ve equilibrasyon sonucu gliserol ilave edilmemiş kontrol grubuna ait ölü spermatozoon oranları, Tümen ve

Özkoca (140)'nın gliserol katmadan glikoz-fosfat sulandırıcısı kullanarak sulandırdıkları ve 5°C'de 8 saat equilibasyon sonucu elde ettikleri %16'lık orandan düşük bulunmuştur. Gliserolasyon ve equilibasyon sonrası ölü spermatozoon oranı arasındaki bu farklılık, araştırmacıların kullanıldığı sulandırıcıların farklı olmasına, araştırmalarda kullanılan hayvanlar arasındaki ırk farklılıklarına ve soğutma tekniklerine bağlı olabilir.

Tasseron ve ark. (135), yaptıkları çalışmada spermanın gliserol içeren sulandırıcı kısmı ile sulandırılması sonrasında motilitede bir azalmanın ve anormal spermatozoon oranında ise bir artışın olduğunu bildirmişlerdir. Gökçen ve ark. (55) ise yaptıkları çalışmada akrozoma bağlı bozukluk oranının gliserolasyon işlemi sonrasında önemli bir artış gösterdiğini belirtmiştir. Bu araştırmacıların bildirdikleri sonuçlar bu çalışmadaki gliserolasyon ve equilibasyon sonrası tespit edilen bulgulara paralellik göstermektedir.

Yapılan araştırmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarında dondurulup çözündürülme sonrası motilite değerleri, gliserol oranının sıfır olduğu **A1-A4** gruplarında 1.0 ± 0.29 ile 1.5 ± 0.33 arasında, gliserol oranının %1 olduğu **B1-B4** gruplarında 14.2 ± 0.79 ile 17.0 ± 0.81 arasında, gliserol oranının %3 olduğu **C1-C4** gruplarında 31.6 ± 1.29 ile 35.4 ± 1.28 arasında, gliserol oranının %5 olduğu **D1-D4** gruplarında 47.4 ± 0.85 ile 51.4 ± 0.70 arasında ve gliserol oranının %7 olduğu **E1-E4** gruplarında da 42.8 ± 0.86 ile 44.6 ± 0.91 arasında değişmiştir.

Yapılan çalışmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarının dondurulup çözündürülmesi sonucunda gliserol oranı değişmeden vitamin C miktarının artışına bağlı olarak motilite oranında bariz bir değişme olmazken, gliserolün %5 ve %7 oranında katıldığı gruplarda çözündürülme sonucu motilite değerlerinin kontrol grubu ve daha düşük oranlara gliserol içeren gruplara göre önemli derecede ($P < 0.05$) arttığı tespit edilmiştir. Bunun nedeni gliserolün hücre içerisindeki suyun yerini alarak spermanın dondurulup çözündürülmesi esnasında buz kristallerinin oluşmasını önlemesi olabilir.

Sunulan çalışmada dondurulup çözündürülme sonucu farklı oranlarda gliserol ve vitamin C katılmış spermalara ait ortalama motilite değerleri, Sanchez-Partida ve ark (118)'lerinin %0, %3 ve %5 oranında gliserol ve 25 mM vitamin C kattıkları tris-yumurta sarısı-sitrik asit-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak pellet şeklinde kuru buz

üzerinde dondurup 37°C'de çözündürmeleri sonucu elde ettikleri sırasıyla %7, %28 ve %43'lük, Molina ve ark. (95)'lerinin %0, %1.5 ve %3 oranında gliserol kattıkları tris-yumurta sarısı-sitrik asit-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak pellet şeklinde kuru buz üzerinde dondurup 37°C'de 5 dk'da çözündürme sonucu elde ettikleri sırasıyla %5.8, %20.2 ve %30.4'lük, Upreti ve ark. (142)'lerinin %3 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak pellet şeklinde dondurup 35°C'de 30 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri % 37'lik, Payne ve ark. (101)'lerinin %3 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.25'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 35°C'de 30 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %36'lık, Colas (31)'in %2 ve %4 oranlarında gliserol kattıkları laktoz-yumurta sulandırıcısı ile sulandırarak 0.5'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 37°C'de 30 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri sırasıyla %38.0 ve %40.4'lük, Gökçen ve ark. (54)'lerinin %5 gliserol katılmış sodyum sitrat-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.25'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 50°C'de 10 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %48'lik, Tekin ve Günzel (136)'in %5 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak mini tüpler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 70°C'de 8 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %54.83'lük, Fiser ve Fairfull (51)'un %5 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.5'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 60°C'de 8 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %44.8'lik, Maxwell ve ark. (90)'lerinin %5 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.25'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 37°C'de 60 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %49.2'lik, Öztürkler ve ark. (100)'lerinin %5 ve %7 oranında gliserol kattıkları tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak pellet şeklinde kuru buz üzerinde dondurup 37°C'de 30 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri sırasıyla %44.0 ve %35.8'lik ve El-Alamy ve Foote (45)'nin %7 oranında gliserol katılmış tris-sitrik asit-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.5'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 40°C'de 3 dk'da çözündürme sonucu elde ettikleri %47'lik motilite değerlerine benzer bulunurken, Abdulhakeam ve ark. (2)'lerinin koç spermasını %0 gliserol içeren Tes-tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.5'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 38°C'de 25 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %29.6'lık, Pontbriand ve ark. (106)'lerinin %3

gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.5'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 37°C'de 20 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %46.2'lik, Sanchez-Partida ve ark. (117)'lerinin %0, %1, %3 ve %5 oranında gliserol kattıkları tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak pellet şeklinde kuru buz üzerinde dondurup 37°C'de 30 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri sırasıyla %19.8, %31.4, %51.2 ve %57.4'lük ve Söderquist ve ark. (130)'lerinin %7 oranında gliserol katılmış yağsız süt sulandırıcısı ile sulandırarak 0.25'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 50°C'de 9 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %63.1'lik değerden düşük, Molina ve ark. (95)'lerinin %4.5 ve %6 oranında gliserol kattıkları tris-yumurta sarısı-sitrik asit-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak pellet şeklinde kuru buz üzerinde dondurup 37°C'de 5 dk'da çözündürme sonucu elde ettikleri sırasıyla %34.5 ve %35.3'lük değerlerden ise yüksek bulunmuştur.

Dondurulup çözündürülme sonucu elde edilen motilite değerleri arasındaki bu farklılıklar çalışmalarda kullanılan değişik sulandırıcılara, içerdikleri kimyasal madde ve miktarlarına, kullanılan dondurma yöntemine, dondurma hızına, çözündürme sıcaklık ve süreleri ile muayeneyi yapan kişinin şahsi değerlendirmesine bağlı olarak şekillenebilir.

Salamon ve Maxwell (111), koç spermasını dondurmak için gliserol ilave edilmesinin yaygın olarak kullanıldığını ve %4-6 arasındaki oranların uygun olduğunu, Öztürkler ve ark. (100), değişik oranlarda gliserol katarak dondurdukları koç spermalarında çözündürme sonrası gerek motilite gerekse morfolojik yönden %5 oranında gliserol katılmasının daha başarılı sonuçlar verdiğini, benzer şekilde Gökçen ve ark. (56), dondurulan ejakülatlarda motilite oranının spermanın dondurulup çözündürülmesi sonucunda ani bir düşüş gösterdiğini ve gruplar arasında %5 gliserol katılmış gruptan motilite yönünden en iyi sonucun alındığını, Fiser ve Fairfull (51)'un, koç spermasının dondurulması amacıyla sulandırıcıya %0 ile %16 oranları arasında gliserol ilave ederek bunun çözündürme sonrası motiliteye etkilerini araştırdıkları çalışmalarında en iyi motilitenin %4-6 arasında gliserol katılmasıyla elde edildiğini ve %8'in üzerindeki gliserol konsantrasyonlarının toksik etki göstererek spermatozoonlar üzerine zararlı etki ettiğini ileri sürmeleri, Roychoudhury ve Bhambhani (109)'nin, benzer olarak koç spermasını dondurmak için %5 oranında gliserol katılmasının iyi sonuçlar verdiğini belirtmesi ve Schmehl ve ark. (120),

yaptıkları tüm denemelerde %4 oranında gliserol katılan örneklerle ait motilite değerlerinin (%39.9) gliserol katılmadan dondurulan örneklerle ait motilite değerlerine (%26.4) göre çözündürme sonrası önemli derecede daha yüksek olduğunu bildirmeleri bu çalışmadaki bulgulara paralellik göstermektedir.

Sunulan araştırmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarında dondurulup çözündürülme sonucu farklı oranlarda gliserol ve vitamin C katılmış spermalara ait akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranları gliserol oranının sıfır olduğu **A1-A4** gruplarında 12.40 ± 0.52 ile 16.14 ± 0.43 arasında, gliserol oranının %1 olduğu **B1-B4** gruplarında 16.98 ± 0.43 ile 18.60 ± 0.44 arasında, gliserol oranının %3 olduğu **C1-C4** gruplarında 28.58 ± 0.48 ile 31.00 ± 0.60 arasında, gliserol oranının %5 olduğu **D1-D4** gruplarında 31.00 ± 0.54 ile 33.12 ± 0.52 arasında ve gliserol oranının %7 olduğu **E1-E4** gruplarında da 37.56 ± 0.92 ile 42.72 ± 1.33 arasında değişmiştir.

Sunulan çalışmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarının dondurulup çözündürülmesi sonucunda gliserol oranı değişmeden vitamin C miktarının artışına bağlı olarak akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranlarında bariz bir değişim olmazken gliserol oranının artırılmasının akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranını önemli derecede ($P < 0.05$) artırdığı tespit edilmiştir. Bunun sebebi koç spermatozoonlarını membran yapısının hassas olması nedeniyle gliserolün hücreye giriş çıkışı esnasında oluşan osmotik basınç değişiklikleri ve spermanın dondurulup çözündürülmesi esnasında hücre membranı dayanıklılığının daha da azalması olabilir.

Yapılan bu çalışmada dondurulup çözündürülme sonucu farklı oranlarda gliserol katılmış spermalara ait akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranları, Byrne ve ark. (27)'lerinin %7 gliserol katılmış yağsız süt-yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırarak 0.25 ml'lik payetler içinde programlanabilir özel dondurucuda dondurup 70°C 'de 8 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %39.7'lik ve Aisen ve ark. (4)'lerinin %6 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-fruktoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.25 ml'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 37°C 'de 10 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri 32.1 ± 1.9 'luk akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı değerlerine benzer bulunurken, Gökçen ve ark. (54)'lerinin %5 gliserol katılmış sodyum sitrat-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.25'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 50°C 'de 10 sn'de çözündürme

sonucu elde ettikleri %14'lük ve yine aynı araştırmacıların (55), %7 gliserol katılmış sodyum sitrat-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.25'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 34°C'de 15 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %27.77'lik değerlerden yüksek, Öztürkler ve ark. (100)'larının %5 ve %7 oranlarında gliserol kattıkları tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak kuru buz üzerinde pellet şeklinde dondurup 37°C'de 30 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri sırasıyla %52.6 ve %56.4'lük, Fiser ve ark (49)'larının %5 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.5 ml'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 60°C'de 8 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %39.8'lik ve Pontbriand ve ark. (106)'larının %3 gliserol katılmış tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak 0.5'lik payetler içerisinde sıvı azot buharında dondurup 37°C'de 20 sn'de çözündürme sonucu elde ettikleri %54.9'luk değerlerden ise düşük bulunmuştur.

Spermaların dondurulup çözündürülmesi sonucu elde edilen akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranları arasındaki bu farklılıklar araştırmalarda kullanılan değişik sulandırıcılara ve içerdikleri kimyasal madde miktarlarının farklı olmasına, uygulanan dondurma yöntemine, dondurma hızına, çözündürme sıcaklık ve süreleri ile muayeneyi yapan kişinin şahsi değerlendirmesine bağlı olarak şekillenebilir.

Yapılan araştırmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarında dondurulup çözündürülme sonucu tespit edilen toplam anormal spermatozoon oranları gliserol oranının sıfır olduğu **A1-A4** gruplarında 20.22 ± 0.58 ile 24.28 ± 0.50 arasında, gliserol oranının %1 olduğu **B1-B4** gruplarında 25.56 ± 0.47 ile 27.80 ± 0.45 arasında, gliserol oranının %3 olduğu **C1-C4** gruplarında 33.32 ± 0.68 ile 36.82 ± 0.99 arasında, gliserol oranının %5 olduğu **D1-D4** gruplarında 35.75 ± 0.69 ile 38.70 ± 0.93 arasında ve gliserol oranının %7 olduğu **E1-E4** gruplarında da 44.84 ± 0.97 ile 49.90 ± 1.36 arasında değişmiştir.

Sunulan çalışmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarının dondurulup çözündürülmesi sonucunda gliserol oranı değişmeden vitamin C miktarının artışına bağlı olarak, toplam anormal spermatozoon oranlarında bariz bir değişme olmazken gliserol oranının artırılmasının toplam anormal spermatozoon oranını önemli derecede ($P < 0.05$) artırdığı tespit edilmiştir.

Bunun sebebi koç spermatozoonlarını membran yapısının hassas olması nedeniyle gliserolün hücreye giriş çıkışı esnasında oluşan osmatik basınç değişiklikleri ve spermanın dondurulup çözündürülmesi sırasında hücre membranının dayanıklılığın daha da azalması olabilir.

Yapılan çalışmada dondurulup çözündürülme sonucu farklı oranlarda gliserol ve vitamin C katılmış sperma gruplarında tespit edilen toplam anormal spermatozoon oranları, Öztürkler ve ark. (100)'larının %5 ve %7 gliserol kattıkları, tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile sulandırarak kuru buz üzerinde pellet şeklinde dondurup 37°C'de 30 sn'de çözdürme sonucu elde ettikleri sırasıyla %52.60 ve %56.90'lık değerlerden düşük bulunmuştur.

Dondurulup çözündürülme sonucu elde edilen toplam anormal spermatozoon oranları arasındaki bu farklılık, araştırmacının kullandığı dondurma yöntemine, dondurma hızına ve çözdürme sıcaklığı ile süresine bağlı olarak şekillenmiş olabilir.

Abdelhakeam (2), dondurma işlemleri esnasında gliserolün spermatozoonları koruyup, çözdürme sonucu motiliteyi artırmasına rağmen akrozomal bozuklukları da artırması nedeniyle spermatozoonların fertilizasyon kabiliyetini azalttığını, bu yüzden gliserol katılmadan, sulandırıcıdaki diğer maddelerin oranları artırılarak ve soğuk sulandırma yöntemi kullanılarak koç spermasının başarılı bir şekilde dondurulabileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada da gliserol katılan gruplarda akrozomal bozuklukların ve toplam anormal spermatozoon oranlarının arttığı tespit edilmiştir. Ancak araştırmacının (2), gliserol katmadan koç spermasını dondurup çözdürmesi sonucu elde ettiği %29.6'lık motilite değeri burada elde edilen bulgulardan yüksektir. Bu, araştırmacının kullandığı sulandırıcı içeriği, sulandırma ve soğutma yöntemlerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Watson ve Martin (144) de, sulandırıcıdaki yumurta sarısı ve değişik şeker oranlarının artırılmasının gliserolün yüksek konsantrasyonlarına olan ihtiyacı azalttığını bildirmiştir.

Yapılan araştırmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarında dondurup çözdürme sonucu tespit edilen ölü spermatozoon oranları, gliserol oranının sıfır olduğu **A1-A4** gruplarında %97.00±0.40 ile %97.64±0.24 arasında, gliserol oranının %1 olduğu **B1-B4** gruplarında %80.72±0.52 ile %83.04±0.36 arasında, gliserol oranının %3 olduğu **C1-C4** gruplarında %58.84±0.42 ile %61.10±0.49 arasında, gliserol oranının %5 olduğu **D1-D4** gruplarında %38.60±0.49 ile %40.80±0.69 arasında ve gliserol

oranın %7 olduğu E1-E4 gruplarında da 44.63 ± 0.87 ile 47.72 ± 0.57 arasında değişmiştir.

Bu çalışmada farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılmış sperma gruplarının dondurulup çözündürülmesi sonucunda gliserol oranı değişmeden vitamin C miktarının artışına bağlı olarak ölü spermatozoon oranlarında bariz bir değişme olmazken gliserol oranının artırılmasının ölü spermatozoon oranını önemli derecede ($P < 0.05$) azalttığı tespit edilmiştir.

Spermanın hızlı bir şekilde dondurulması, hücrelerin dehidrasyonundan kaynaklanan membrana bağlı değişiklikleri önlemesine rağmen mekanik zararlara yol açan geniş buz kristallerinin şekillenmesine yol açmakta, bu durum da çözdürme esnasında spermatozoonların yapısal olarak zarar görmesine ve ölmelerine yol açmaktadır (2, 62, 120). Bu çalışmada gliserol katılmadan dondurulan gruplarda ölü spermatozoon oranının çok yüksek olması da buna bağlı olabilir.

Sunulan çalışmada dondurup çözdürme sonucu farklı oranlarda gliserol ve vitamin C katılmış sperma gruplarında tespit edilen ölü spermatozoon oranları Mesaros ve ark. (92)'lerinin %5 gliserol kattıkları tris-yumurta sarısı-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısı ile sulandırarak kuru buz üzerinde pellet şeklinde dondurup oda sıcaklığında çözdürme sonrası elde ettikleri %50.8'lik değerden düşük bulunmuştur.

Dondurulup çözdürülme sonucu elde edilen ölü spermatozoon oranları arasındaki bu farklılık, çalışmalarda kullanılan sulandırıcıların farklı olmasına, equilibasyon süresine, kullanılan dondurma yöntemine ve hızına, çözdürme sıcaklık ve süresine bağlı olarak şekillenmiş olabilir.

Dondurma işlemlerinden önce sulandırılmış spermaya gliserol ilave edilmesinin solüsyonun donma noktasını düşürdüğü ve gliserolün hücre içerisine girerek intrasellüler suyun dışarı çıkmasını sağlamak suretiyle hücre içerisinde geniş buz kristallerinin oluşmasını engellediği bildirilmektedir (18, 40, 62). Ancak buz kristallerinin tamamen önlenmesi için %30'dan daha fazla gliserol ilave edilmesi gerektiği (40, 63), ilave edilen gliserol oranına bağlı olarak spermanın motilite oranında ve fertilizasyon kapasitesinde azalma olduğu ve bu oranın mümkün olduğunca azaltılması gerektiği yapılan çalışmalar sonucunda tavsiye edilmektedir (2, 71, 73, 107).

Watson (145), spermaya gliserol ilave edilmesi sonucu gliserolün hücre içerisine girmesi ve dondurup çözdürme sonucunda hücreden çıkışı sırasında

spermatozoonlar üzerinde osmatik stres oluşturduğunu ve bunun spermatozoon motilitesine ve morfolojik yapılarına zarar verdiğini bildirmiştir. Bunun aksine Fiser ve Fairfull (51), gliserolün hücre içerisine girişi ve hücreden çıkışı esnasında osmatik bir şokun oluştuğunu ancak koç spermatozoonlarının bu osmatik değişikliklere tolere edebilme yeteneğinin olduğunu ve dondurma çözündürme işlemleri sırasında oluşan osmatik değişikliklerden fazla etkilenmediğini ileri sürmüş ve spermanın 4°C'de % 4-6 arasında gliserol katılarak hızlı bir şekilde dondurulması sonucu en iyi motilite sonuçları elde edildiğini bildirmiştir. Fiser ve Fairfull (51) tarafından tespit edilen değerler bu araştırmanın sonuçları ile benzer doğrultudadır.

Salamon (113), sulandırıcıya %6'nın üzerinde katılan gliserolün toksik etki göstermesinden dolayı çözündürme sonucunda motilitenin azalmasına ve akrozomal bozuklukların artmasına neden olduğunu bildirmiştir. Bunun yanısıra sulandırıcıya gliserolden başka antioksidantların ilave edilmesinin gliserole olan ihtiyacı azalttığını ve sadece %2-3.5 oranında katılabileceğini bildirmiştir.

Sunulan bu çalışmada gliserol oranının artmasına bağlı olarak akrozomal bozuklukların da arttığı gözlenmiş ancak gliserol oranı azaltıldığında motilitenin düştüğü ve antioksidant bir madde olan vitamin C'nin sperma sulandırıcılarına ilave edilmesinin motilite, akrozomal bozukluklar ve diğer spermatolojik özellikler üzerine olumlu bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

Sanchez-Partida ve ark (118)'da, spermanın uzun süre başarılı bir şekilde saklanması, dondurma ve çözündürme sırasında oluşan stresten hücreleri koruyucu etkiye sahip cryoprotectant'lar içeren bir sulandırıcı ile spermanın sulandırılmasına bağlı olduğunu, ancak gliserol gibi soğuğa karşı koruyucu ajanların spermada bulunmasının dondurup çözündürme esnasında spermatozoon plasma membranına zarar verdiğini bu yüzden sperma sulandırıcılarına antioksidantların ilave edilmesinin dondurma esnasında spermatozoonlarda meydana gelebilecek hasara engel olabileceğini ileri sürmüş ve yaptıkları çalışmada %0; %3 ve %5 oranında gliserol ilave ettikleri koç spermasını ayrı ayrı gruplara ayırarak sırasıyla 25, 50, 75 ve 100 mM vitamin C ilave edip pellet şeklinde kuru buz üzerinde dondurduklarını, çözündürme sonrası motilite yönünden %3 ve %5 oranında gliserol katılan örneklerle %0 gliserol katılanlar arasında önemli derecede fark olduğunu, askorbik asit yönünden ise; 25 mM katılan grupta motilite etkilenmezken 50, 75 ve 100 mM katılan gruplarda motilitenin azaldığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Askari ve

ark. (13) ile Donnelly ve ark. (43)'da insan spermasının dondurulması esnasında spermaya çeşitli oranlarda vitamin C katılmasının dondurup çözündürme sonucu spermatolojik özelliklerde önemli bir değişikliğe sebep olmadığını bildirmeleri bu çalışmadaki bulgulara benzerlik göstermektedir.

Ancak Stoianov ve ark. (134), yaptıkları çalışmada, boğa spermasını vitamin C ilave edilmiş sulandırıcı ile sulandırıp dondurduklarını, çözündürme sonucu bu spermalardan kontrol grubundakilere göre daha yüksek bir motilite elde ettiklerini ve yaptıkları tohumlamalar sonucunda yine kontrol grubuna göre %9 oranında daha fazla bir gebelik oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu durum sulandırıcıya katılan farklı maddelere bağlı olabileceği gibi büyük ölçüde tür farklılığından da kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak koçlara intramusküler Vitamin C uygulanmasıyla kan serumu ve spermada yükselen vitamin C düzeyi, spermanın miktar ve yoğunluğunu önemli derecede artırdığından aşım mevsiminde yapılacak vitamin C enjeksiyonlarının koçlarda sperma kalitesini olumlu yönde etkileyeceği söylenebilir.

Ayrıca, farklı oranlarda gliserol ve vitamin C içeren sulandırıcılarla sulandırılan koç spermalarında gliserolasyon ve equilibasyon sonrası gliserol oranı artışının (%0-%7) dondurma işlemi öncesi spermatolojik özellikleri olumsuz yönde etkilemesine rağmen dondurup çözündürme sonrası en iyi sonuçlar %5 gliserol katılmış gruplardan elde edilmiştir.

Bununla birlikte gliserol oranının sabit olduğu sulandırıcı gruplarına farklı miktarlarda katılan vitamin C'nin ise gerek gliserolasyon ve equilibasyon sonucu gerekse dondurulup çözündürülme sonucu spermatolojik özellikler üzerine önemli bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Abdelhakeam A A, Graham E F, Vazquez I A. (1991). Studies on 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: 36-42.
2. Abdelhakeam A A, Graham E F, Vazquez I A, Chaloner K M. (1991). 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*. 28: 43-49.
3. Acotts T S, Carry D W. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididimal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol Reprod*. 30: 926-935.
4. Aisen E G, Alvarez H L, Venturino A, Garde J J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53: 1053-1061.
5. Akçapınar H. (2001). Koyun yetiştiriciliği 2. Baskı İsmat Matbaacılık Ltd. Sti. Ankara.
6. Aksoy M, Ataman M B, Karaca F, Kaya A, Tekeli T. (1994). Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait çeşitli ırklardan koçların spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar *Hay. Arş. Derg.* 10(1-2): 111-112.
7. Aksoy M, Tekeli M, Çoyan K, Karaca F. (1993). Konya Merinosu koçlarının spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. *Hay. Arş. Derg.* 3(2): 126.
8. Al-Hanak H, Spasova D. (1983). Preservation of ram seminal fluid in different diluents. *Vet. Med. Nauki*. 20(7): 74-82.
9. Altıntaş A, Fidancı U R. (1993). Evcil hayvanlarda ve insanda kanın biyokimyasal normal değerleri *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* 40(2): 173-186.
10. Anderson R, Luckey P T. (1987). A biological role for ascorbate in the selective neutralization of extracellular phagocyte-derived oxidants. *Ann N.Y. Acad Sci*. 498: 229-247.
11. Anonim. (2001). Hayvancılık Özel İhtisas Komisyonu Raporu. 8. Beş yıllık Kalkınma Planı, Yayın No: DPT: 2574 - ÖİK: 589, Ankara.
12. Artiga C G, Garde J, Gutierrez A A, Vazquez I. (1992). Seminal characteristic of Manchego ram. *Proceedings of the 12 th. International Congress on Animal Reproduction. The Hague-The Netherlands. Volume I*: 399-401.
13. Askari H A, Check J H, Peymer N, Bollendorf A. (1994). Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acid in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch. Androl*. 33(1): 11-15.
14. Ataman M B. (1996). Koyunların donmuş-çözülmüş sperma kullanılarak laparoskop yardımıyla intrauterin olarak tohumlanması. *S. Ü. Sağ. Bil. Enst. Doktora Tezi*, Konya.
15. Aurich J E, Schönherr U, Hoppe H, Aurich C. (1987). Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*. 48: 185-192.
16. Başpınar N, Serpek B. (1993). Gebe koyunlarda vitamin C, seruloplazmin, glikoz ve hemoglobin değerlerinin postpartum ilk aya kadar değişimleri ve bu parametreler arasındaki ilişkiler. *Hay. Arş. Derg.* 3(2): 88-92.
17. Baykut F. (1998). Vitamin C, L (-) Askorbik Asit. İst. Üniv. Biyomedikal Mühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul.

18. Bearden H J, Fuquay J W. (1992). *Applied Animal Reproduction*. 3rd Ed. Englrwood Cliffs, New Jersey.
19. Beconi M T, Francia C R, Mora N G, Affrancino M A. (1996). Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*. 46: 791-797.
20. Bernstein A D, Petropavlovsky V V. (1937). Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Bjull. Eksp. Biol. Med.* 3(1): 41-43.
21. Biswas N M, Chaudhuri A, Sarkar M, Biswas R. (1996). Effect of ascorbic acid on invitro synthesis of testosterone in rat testis. *Indian J Exp Biol.* 34(6): 612-613.
22. Black W D, Hidiroglu M. (1996). Pharmacokinetic study of ascorbic acid in sheep. *Can. J. Vet. Res.* 60(3): 216-221.
23. Blackshaw A W. (1960). The effects of milk diluents on the viability of ram spermatozoa and their revival after freezing. *Aust. Vet. J.* 36: 432-435.
24. Blondin P, Coenen K, Sırard M A. (1997). The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J. Androl.* 18(4): 454-460.
25. Bozkurt T, Demirci E, Gündoğan M. (1999). Yumurta sarısı + süt tozu, yumurta sarısı + sodyum sitrat ve yumurta sarısı + sodyum sitrat + glikoz solüsyonları ile sulandırılan ve buzdolabında (4°C) saklanan koç spermalarının günlük motilitesi. *F.Ü. Sağ. Bil. Derg.* 13(2): 177-183.
26. Buettner G R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 300: 535-543.
27. Byrne G P, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan J P, Boland M P. (2000). Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 62(4): 265-275.
28. Cameron R D A. (1977). Semen collection and evaluation in the ram. The effect of method of stimulation on response to electroejaculation. *Aust. Vet. J.* 53(8): 380-383.
29. Ciereszko A, Dabrowski K. (1995). Sperm quality and ascorbic concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: across-season study. *Biol. Reprod.* 52(5): 982-988.
30. Cochran R C, Judy J K, Parker C F, Hallford D M. (1985). Prefreezing and post-thaw semen characteristics of five ram breeds collected by electroejaculation. *Theriogenology*. 23(3): 431-440.
31. 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):277-85.
32. Correa J R, Rodriguez M C, Patterson D J, Zavos P M. (1996). Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effect on sperm viability, osmotic shock and sperm membran integrity. *Theriogenology*. 46: 963-971.
33. Çamaş H, Ergun H. (1985). Kuzuların kanında methemoglobin ve vitamin C değerleri ile Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine araştırmalar. *U. Ü. Vet. Fak. Derg.* 4: 35-41.
34. Daader A H, El-Keraby F, Marai I F M, El-Jibouri S A H. (1987). Ram semen characteristics as affected by some climatic elements in Sub-tropical conditions. *Egyptian J. Of Anim. Prod.* 25(1): 105-116.
35. Dabrowski K, Ciereszko A. (1996). Ascorbic acid protects against male infertility in a teleost fish. *Experientia*. 52(2): 97-100.

36. Danasouri İ E. (1988). Effect of thawing temperature on the loss of acrosome and hyaluronidase enzymes from bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 29(6): 1343-1346.
37. Daunter B, Hill R, Hennessey J, Mackay E V. (1981). Seminal plasma biochemistry. I. Preliminary report: a possible mechanism for the liquefaction of human seminal plasma and its relationship to spermatozoal motility. *Andrologia*. 13(2): 131-141.
38. Dautier L. (1956). Quelques resultats sur l'insemination artificielle des brebis et des chevres en France. *Proc. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemin., Cabridge*. 3: 12-14.
39. Dawson E B, Harris W A, Rankin W E, Charpentier L A, McGanity W J. (1987). Effect of ascorbic acid on male fertility. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 498: 312-323.
40. De Leeuw F E, De Leeuw A M, Den Daas J H G, Colenbrander B, Verkleij A J. (1993). Effects of various cryoprotectant agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 30: 32-44.
41. Demirci E. (2000). Evcil hayvanlarda reproduksiyon, suni tohumlama ve androloji. *F. Ü. Vet. Fak. Ders Notları No: 45, Elazığ*.
42. Demirci E. (1993). İvesi koçların spermatolojik özellikleri ve sperma miktarının hayvanın yaşı ve testis hacmi ile ilişkisi. *U. Ü. Vet. Fak. Derg.* 3(12): 98-106.
43. Donnelly E T, McClure N, Lewis S E. (1999). Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil Steril*. 72(3): 484-495.
44. Dvorak M, Podany J. (1971). Ascorbic acid levels in the genital glands of breeding boars and castrates. *Acta Vet.* 40: 397-403.
45. El-Alamy M A, Foote R H. (2001). Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim. Reprod. Sci.* 65: 245-254.
46. Elwisby A B, El Mikkawi F, Omar A A. (1976). Some aspect of reproduction in fat-tailed sheep in the subtropics V. Seasonal variation in sexual desire and semen characteristics. *Beitr. Trop. Landwirtschaft Veterinarmed.* 14(3): 303-311.
47. Emmens C V, Blackshaw A W. (1950). The low temperature storage of ram, bull and rabbit spermatozoa. *Austr. Vet. J.* 26: 226-228.
48. Evans G. (1988). Current topics in artificial insemination of sheep. *Aust. J.Biol. Sci.* 41(1): 103-116.
49. Fiser P S, Ainsworth L, Fairfull R W. (1987). Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 28(5): 599-607.
50. Fiser P S, 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.
51. Fiser P S, Fairfull R W. (1989). The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 26(1): 64-69.
52. Fiser P S, Fairfull R W, Marcus G J. (1986). The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. *Cryobiology*. 23(2): 141-149.
53. Fraga C D, Motchnik P A, Shinegana M K, Helbock H J, Jacob R A, Ames B N. (1991). Ascorbic acid protects against oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci.* 88: 11003-11006.

54. Gökçen H, Aştı R N, Kozandağı M. (1983). Çeşitli ekilibasyon süreleri ve çözme ısılarının donmuş koç spermatozoonlarının motilitesi ve akrozom bozuklukları üzerine etkisi. U. Ü. Vet. Fak. Derg. 1(2): 51-58.
55. Gökçen H, Aştı R N, Kozandağı M. (1983). Sulandırıcıya değişik oranlarda katılan gliserolün dondurma işleminin çeşitli evrelerinde koç spermatozoonlarının motilitesi ve akrozom morfolojisi üzerine etkisi. U. Ü. Vet. Fak. Derg. 1(2): 59-64.
56. Gökçen H, Erdinç H, Çamaş H, Çekgöl E, Şener E. (1984). Koç rasyonlarına katılan pamuk tohumu küspesinin sperma verimi ve etkisi üzerine araştırmalar. U. Ü. Vet. Fak. Derg. 1(3): 93-101.
57. Graham EF, Crabo B G, Pace M M. (1978). Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. J. Anim. Sci. 47(2): 80-119.
58. Gülyüz F, Yıldız C. (1995). Değişik ırktan koçların spermatolojik özellikleri ve dölverimleri üzerinde araştırmalar Y. Y. Ü. Vet. Fak. Derg. 6(1-2): 60-63.
59. Gündoğan M, Demirci E. (1999). Koçlarda scrotal sıcaklık artışının spermatogenesis ve diğer spermatolojik özellikler üzerine etkisi. F. Ü. Sağ. Bil. Derg. 13(2): 193-200.
60. Gür S, Tatlı P. (1999). Koçların testis ölçüleri ve spermatolojik özellikleri üzerine rasyonda bulunan soya fasülyesi ve pamuk tohumu küspesinin etkisi. F. Ü. Sağ. Bil. Derg. 13(3): 413-420.
61. Haag W. (1985). Zur methodik und praktischen bedeutung der Vitamin C bestimmung beim rind in vergangenheit und gegenwart. Inagural-Dissertation. Justus-Liebig universitat. Giessen.
62. Hafez E S E. (1985). Reproduction in Farm Animals. 5th Ed. Lea-Febger, Philadelphia.
63. Hammerstedt R H, Graham J K, Nolan J P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what me ask them to survive. J. Androl. 11(1): 73-88.
64. Harris W A, Harden T E, Dawson E B. (1979). Apparent effect of ascorbic acid medication on semen metal levels. Fertil. Steril. 32(4): 455-459.
65. Hill J R, Godley W C, Hurst V. (1959). Effect of glycerol, equilibration time, glycerol level and rate of temperature descent on the freezing of ram spermatozoa. J. Anim Sci. 18: 614-621.
66. Hinkovska-Galcheva V, Petkova D, Koumanov K. (1989). Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. Cryobiology. 26(1): 70-75.
67. Hughes C M, Lewis S E, McKelvey-Martin V J, Thompson W. (1998). The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. Hum. Reprod. 13(5): 1240-1247.
68. Ito Y, Tsuji M, Terada N, Miyano M, Mori H. (1992). Testosterone production in mature scorbutic mutant rats unable to synthesize ascorbic acid. Int J Androl. 15(2): 160-169.
69. Jacob R A, Pianalto F S, Agee R E. (1992). Cellular ascorbate depletion in healthy men. J. Nutr. 122: 1111-1118.
70. Jain M C. (1987). Ascorbic acid concentration in bovine and bubaline semen. Arch. Exp. Veterinermed. 41(4): 550-555.
71. Jeyendran R S, Van der Ven H H, Perez-Pelaez M, Zaneveld L J. (1985). Effect of glycerol and cryopreservation on oocyte penetration by human spermatozoa. Andrologia. 17(3): 241-248.

72. Jeyendran R S, Van der Ven H H, Perez-Pelaez M, Zaneveld L J. (1984). Comparison of gliserol and a ion buffer system as cryoprotective media for human spermatozoa. Effect on motility, penetration of zona-free hamster oocytes, and acrosin/proacrosin. *J. Androl.* 5(1): 1-7.
73. Johnson L, O'Connor M L, Chandler P T, Meacham T N, Saacke R G. (1974). Optima glycerol, Tris and thaw rate in freezing ram semen *J. Anim. Sci.* 39: 213.
74. Jones R, Mann, T. (1977). Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J. Reprod. Fertil.* 50(2): 261-268.
75. Jones R C. (1969). Studies of the suitability of preparations of ewe and cow milk for storing ram spermatozoa at 37, 5 and -79°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 983-994.
76. Kalev G, Zagorski D, Zahariw Z, Kitchen G, Georgiev G. (1969). İnsemination of ewes with deep frozen semen. *Veterinarnomed. Nauk.* 6: 13-17.
77. Kaya A, Çoyan K, Yıldız C, Ataman M B. (1998). Dondurulmuş boğa spermasını değişik ısı ve sürelerde çözündürmenin spermatolojik özellikler ve payet iç ısısı üzerine etkisi *Hayv. Arş. Derg.* 8(1-2): 29-33.
78. King G J. (1993). *Reproduction in Domesticated Animals*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
79. Knight C A, Dutcher R A, Guerrant N B, Bechdel S I. (1940). Destruction of ascorbic acid in the rumen of dairy cow. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y.* 4: 90-93.
80. Kolb E. (1984). Metabolism of Ascorbic Acid in livestock under Pathological Conditions. In: "Workshop Askorbic Acid in Domestic Animals" Wegger I, Tagwerker F J, Moustgaard J. (Ed). Royal Danish Agr. Soc., Copenhagen. Sayfa; 162-168.
81. Kolb E, Kouider S, Kuba M, Leo M, Wahren M, Völker L. (1994). The concentration of ascorbic acid, glucose and cortisol in the blood plasma of sheep and excretion of ascorbic acid in the urine after i.v. administration of the compound. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 136(3): 95-104.
82. Kramer R Y, Garner D L, Ericsson S A, Wesen D A, Downing T W, Redelman D. (1991). The effect of cottonseed components on testicular development in pubescent rams. *Vet. Hum. Toxicol.* 33(1): 11-16.
83. Kutsky R J. (1973). *Hand Book of Vitamins and Hormons*. Von Nostrand Reinhold Co. N.Y.
84. Kyaw A. (1978). A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. *Clinica Chimica Acta.* 86: 153-157.
85. Lapwood K R, Martin I C A. (1966). The use of monosaccharides, disaccharides and trisaccharides in synthetic diluents for the storage of ram semen at 37°C and 5°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 19: 655-671.
86. Lewis S E, Sterling E S, Young I S, Thompson W. (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 67(1): 142-147.
87. Lindahl P E, Kihlstrom J E. (1954). An antiagglutinin factor in mammalian seminal plasma. *Fertil Steril.* 5: 241.
88. Lindahl P E. (1960). Some factors influencing the biological activity of sperm agglutinins. *J. Reprod. Fertil.* 1: 3-22.
89. Luck M R, Jeyaseelan I, Scholes R A. (1995). Ascorbic acid and fertility. *Biol. Reprod.* 52: 262-266.

90. Maxwell W M C, Landers A J, Evans G. (1995). Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*. 43: 1201-1210.
91. Maxwell W M C, Salamon S. (1993). Liquid storage of ram semen *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 613-638.
92. Mesaros P, Gamcik P. (1992). The possibility of freezing ram semen in a diluent without glycerol. *Anim Breed Abst.* 60, No:10, Abst No: 6159, 787.
93. Milovanov V K. (1933). Three years'work on dilutors for sperm of livestock *Anim. Breed. Abstr.* 3, No: 153.
94. Milovanov V K. (1940). The present state of storage and transport of semen of farm animals. *Trudy Lab. Iskusst. Osem. Zivotn., Moscow.* 1: 85-107.
95. Molinia F C, Evans G, Maxwell W M C. (1994). Effect of polyols on the post-thawing motility of pellet frozen ram spermatozoa. *Theriogenology*. 42: 15-23.
96. Molinia F C, Evans G, Quintana Casares P I, Maxwell W M C. (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36(1-2): 113-122.
97. Nicolas F. (1950). Vitamin C et reproduction. *These Doct. Vet., Paris.*
98. Ollero M, Muino-Blanco T, Lopez-Perez M J, Cebrian-Perez J A. (1996). Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *J. Chromatogr. B.* 680(1-2): 157-164.
99. Özkoca A. (1965). Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen Merinos koçlarının ve Ankara keçisi tekelerinin sperma özellikleri üzerine araştırmalar. *Lalahan Zoot. Arş. Ens. Derg.* 5: 19-25.
100. Öztürkler Y, Ak K, İleri İ K. (1999). Koç spermasının yoğun gliserollü sulandırıcılarda dondurulması. 25(2): 399-414.
101. Payne S R, Oliver J E, Upreti G C. (1994). Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 31: 180-184.
102. Pettruzzi V, Tarantini S, Roychoudhury P N. (1976). Effect of different semen diluents on survival of ram spermatozoa at 5°C. *Zentralblatt-fur-Veterinarmedizin, A.* 23(7): 556-561.
103. Phillips P H, Lardy H A, Heizer E E, Rupel I W. (1940). Sperm stimulation in the bull through the subcutaneous administration of ascorbic acid. *J. Dairy Sci.* 23: 873-878.
104. Phillips P H, Lardy H A. (1940). A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.* 23: 399-404.
105. Polge C, Smith A U, Parkes, A S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (Lond.)* 164: 666.
106. Pontbriand D, Howard J G, Schiewe M C, Stuart L D, Wildt D E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 26(4): 341-354.
107. Radev G, Semkov M, Ivanov I. (1973). Motility and respiration of ram spermatozoa stored at -196°C as affected by various amounts of glycerin in the semen diluent. *C. R. Acad. Agric.* 6: 373-375.

108. Robinson J A, Gulick B A, Hodges R E, Glad B W. (1979). Comparative studies of whole blood and plasma ascorbic acid levels in some species of animals. *Fed. Proceed.* 38(31): 556.
109. RoyChoudhury P N, Bhambhani G. (1977). Pellet freezing of ram spermatozoa. *Zentral. Fur Veterinaemedizin.* 24(8): 696-700.
110. Saez L A, Ortiz N, Gallego L, Garde J J. (2000). Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. *Arch. Androl.* 44(2): 155-164.
111. Salamon S, Maxwell W M C. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3): 77-111.
112. Salamon S, Lightfoot R J. (1969). Freezing of ram spermatozoa by the pellet method I. The effect of diluent composition on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 1527-1546.
113. Salamon S, 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.
114. Salamon S, Visser D. (1972). Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust. J. Biol. Sci.* 25: 605-618.
115. Saleh I A. (1997). Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Anim. Reprod. Sci.* 49(2-3): 161-167.
116. Salisbury G W, Fuller H K, Willett E L. (1941). Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. *J. Dairy Sci.* 24: 905-910.
117. Sanchez-Partida L G, Setchell B P, Maxwell W M C. (1998). Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 10(4): 347-357.
118. Sanchez-Partida L G, Setchell B P, Maxwell W M C. (1997). Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 9(7): 689-696.
119. Saroff J, Mixner J P. (1955). The relationship of egg yolk and glycerol content of diluents and glycerol equilibration time to survival of bull spermatozoa after low temperature freezing. *J. Dairy Sci.* 38: 292-297.
120. Schmehl M K, Vazquez I A, Graham E F. (1986). The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology.* 23(6): 512-517.
121. Semkov M M, Zakhariyev Z. (1972). Comparison of some semen diluents for use in deep freezing of ram semen. *Zhivotnovud. Nauki.* 9: 105-111.
122. Senger P L. (1986). Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. In. "Current therapy in Theriogenology" Morrow D A. (Ed.) Saunders company, Philadelphia. Sayfa 162-174.
123. Setchell B P. (1997). Sperm counts in semen of farm animals 1932-1995. *Int J Androl.* 20: 209-214.
124. Sevinç A. (1977). Dölerme ve Suni Tohumlama. F. Ü. Vet. Fak. Yayın No: 12. Elazığ.
125. Sharma R K, Agarwal A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology.* 48(6): 835-850.
126. Sikka S C, Rajasekaran M, Hellstrom W J G. (1995). Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl.* 16(6): 464-468.

127. Sinha N K, Sahni K L. (1985). Effect of age and season on certain characteristics of Muzaffarnagri Rams. *Ind. J. Of Anim Health.* 24(1): 45-48.
128. Slavik T. (1987). Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster egg. *J. Reprod. Fertil.* 79(1): 99-103.
129. Soylu K. (1988). Çeşitli sulandırıcılar ve yöntemler kullanılarak dondurulan koç spermalarının bazı spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, İstanbul.
130. Söderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H. (1997). Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology.* 48(7): 1115-1125.
131. Spallanzani L. (1976). "Opuscoli di Fisica Animale, a Vegetabile" Op. II. Osservazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermatici dell'uomo e degli animali. (Presso la Societa' Tipographica: Nodena.)
132. Srivastava A, Chopra S K, Dasgupta P R. (1983). Biochemical analysis of human seminal plasma. I. Fructose, ascorbate, cholesterol, adenosinetriphosphatase and lactic dehydrogenase. *Andrologia.* 15(5): 431-435.
133. Stoianov T, Kostadinov B. (1978). Attempts at freezing bull semen in a yolk raffinose medium without glycerin. *Vet. Med. Nauki.* 15(3): 47-54.
134. Stoianov T, Zagorski D. (1987). Test of a new medium for the thawing of granulated bull seminal fluid. *Vet. Med. Nauki.* 24(8): 91-95.
135. Tasserion F, Amir D, Schindler H. (1977). Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J. Reprod. Fertil.* 51(2): 461-462.
136. Tekin N, Günzel A R. (1986). Koç spermasının değişik sulandırıcılarda dondurulması ve invitro değerlendirilme yöntemleri üzerine araştırmalar. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* 33(3): 381-393.
137. Tervit H R, Smith J F, Goold, P G, Drost H. (1978). Insemination of sheep with fresh or frozen semen. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 38: 97-100.
138. Thiele J J, Friesleben H J, Fuchs J, Ochsendorf F R. (1995). Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum. Reprod.* 10(1): 110-115.
139. Tsekova E, Spasov K, Angelova M, Georgiev G K. (1986). Effect of cryopreservation on the acrosomal enzyme activity of the spermatozoa of rams. *Vet. Med. Nauki.* 23(1): 73-76.
140. Tümen H, Özkoca A. (1994). Çeşitli tekniklerle sulandırılıp tohumlamada kullanılan koç spermasının spermatolojik özellikleri ve dölverimleri üzerinde araştırmalar. *Tr. J. of Vet. Anim. Sci.* 18: 287-291.
141. Unal M B, Berndtson W E, Pickett B W. (1978). Influence of sugars with glycerol on post-thaw motility of bovine spermatozoa in straws. *J. Dairy Sci.* 61: 83-89.
142. Upreti G C, Payne S R, Duganzich D M, Oliver J E, Smith J F. (1996). Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 41(1): 27-36.
143. Visser D, Salamon S. (1973). Fertility of ram semen frozen in a tris-based diluent. *Austr. J. Biol. Sci.* 26: 513-516.
144. Watson P F, Martin I C A. (1975). Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 28(2): 153-159.

145. Watson P F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci. 60-61: 481-492.
146. Watson P F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. J. Reprod. Fertil. 62: 483-492.
147. Yamane J, Kato K. (1928). Über die Wasserstoffionenkonzentration des spermas beim Pferde und ihr Wirkungsoptimum auf die Vitalität der Spermatozoen beim Pferde und Kaninchen. Z. Tierzücht. Zücht. Biol. 12: 347-364.



8. ÖZGEÇMİŞ

Kayseri 1975 doğumluyum. İlk öğrenimimi Kayseri M. Ali Bakkaloğlu ilkokulunda, orta öğrenimimi de Kayseri Fevzi Çakmak Lisesinde tamamladım. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesine 1991 yılında girerek 1996 yılında mezun oldum. F. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Programı, Dölerme ve Suni Anabilim Dalında 1996 yılı Güz döneminde doktora çalışmalarına başladım. Aynı Anabilim Dalında 1997 yılı Kasım ayında Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen aynı görevimi sürdürmekteyim.

Arş. Gör. Mustafa SÖNMEZ

