

## Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri\*

Necmettin TEKİN, Ongun UYSAL, Ergun AKÇAY, İlker YAVAŞ,

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara.

**Özet:** Çalışmada koç ejakülatlarının dondurulması ve çözündürülmesi sürecinde sperma sulandırıcısına katılan farklı dozlarda antioksidan (taurin) ile değişik hızlarda soğutmanın başlıca spermatolojik değerler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmada toplam 3 koçtan (Akkaraman, Sakız, Ramlıç) sun'i vagina ile alınan ejakülatlar kullanılmıştır. Çift ejakülat olarak alınan ve başlıca spermatolojik özellikleri belirlenen normospermi kalitesindeki ejakülatlar birleştirilerek kullanılmıştır. Araştırma ve kontrol gruplarında spermalar split ejakülat biçiminde değerlendirilmiştir. Spermaların sulandırılması ve dozlanması farklı taurin dozları (20, 50 ve 80 mM) ve % 4 glyserol içeren Tris ana sulandırıcısı ile yapılmıştır. Ayrıca taurin içermeyen kontrol grubu da oluşturulmuştur. Sulandırma ve dozlama işlemleri sonrasında 0.25 ml lik payetlere çekilen spermalar otomatik ve programlanabilir aletle farklı soğutma hızlarında (I- 15 °C/dak; II- 10 °C/dak; III- 5 °C /dak) dondurulmuştur. Dondurulan spermalar su banyosunda 40°C de 10 saniye tutularak çözündürülmüşlerdir. Çözürme sonrası yapılan değerlendirmelere göre, sulandırıcıda 20, 50 ve 80 mM taurin içeren ve taurin içermeyen (kontrol) gruplarda spermatozoa motilitesi sırasıyla % 38.7, 31.1, 26.5 ve 34.4 kaydedilmiştir. Anormal spermatozoa oranı % 18.7, 18.4, 17.0 ve 19.0 bulunurken, ölü spermatozoa oranı % 52.2, 60.3, 61.5 ve 54.7 saptanmıştır. Soğutma hızı gruplarında (I, II ve III), çözürme sonrası spermatozoa motilitesi % 30.0, 33.1 ve 32.0; anormal spermatozoa oranı % 17.7, 17.7 ve 23.0 ve ölü spermatozoa oranı % 62.0, 54.0 ve 56.8 olarak saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, koç spermasının dondurulmasında farklı taurin dozlarının ve dondurma hızlarının istatistik değerlendirmede önemli farklılıklar göstermediği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Spermanın dondurulması, dondurma hızı, koç, taurin.

### Effects of different taurine doses and freezing rate on freezing of ram semen

**Summary:** In this study, it was aimed to investigate of effects of different doses antioxidant (taurine) added to extender and various cooling rates on some spermatological parameters during freezing and thawing of ram ejaculates. Ejaculates collected by artificial vagina from 3 rams (Akkaraman, Sakız, Ramlıç) were used in the study. Ejaculates collected double ejaculation, determined principle spermatological properties and having/with normospermie quality were pooled. Samples were evaluated as split ejaculate in the experiment and control groups. Samples were extended with Tris extender containing 4 % glycerol and different taurine doses (20, 50 ve 80 mM). It was also formed control group that is not contain taurine. After dilution and dose processing, samples withdrawn to 0.25ml straws were frozen in programmable and automatic freezer at different cooling rates (I- 15 °C/min; II- 10 °C/min; III- 5 °C/min). Frozen semen were thawed in a water bath at 40 °C for 10 seconds. According to post-thawing assessing, in the semen which was diluted with tris diluent containing 20, 50, 80 mM taurine and without taurine (control) groups, the sperm motility values were recorded as 38.7, 31.1, 26.5 and 34.4 % respectively. The percentages of abnormal spermatozoa were found 18.7, 18.4, 17.0, and 19.0 %, the percentage of dead spermatozoa were determined 52.2, 60.3, 61.5 and 54.7 % respectively. In I, II and III groups of cooling rates, post-thawing sperm motility values were determined 30.0, 33.1, 32.0 %, the percentages of abnormal spermatozoa were found 17.7, 17.7, 23.0 % and the percentages of dead spermatozoa were recorded as 62.0, 54.0, 56.8 % respectively. According to the obtained results, it was determined that different taurine doses and cooling rates did not showed significant differences as statistically in the cryopreservation of ram semen.

Key words: Freezing of semen, freezing rate, ram, taurin.

### Giriş

Koç spermasının dondurulması ve dondurulmuş spermalarla ilk sun'i tohumlama uygulamaları Sovyetler Birliği'nde başlamış, sonra Avrupa ülkelerine geçmiştir.

Türkiye'de ise Cumhuriyet'in ilk yıllarında başlatılan koyun ıslahı çalışmaları günümüzde henüz istenen

başarıya ulaşamamıştır. Türkiye, 26 972 000 ( 26) koyun varlığı ile hayvancılık sektörü içinde önemli bir yere sahipken, verim açısından aynı düzeyde olduğu söylenemez. Bunun çeşitli nedenleri olmakla birlikte, henüz koç spermasının başarıyla dondurulamaması ve koyunlarda sun'i tohumlamanın etkin yapılamaması sayılabilir (23).

\* Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2003. 08. 10. 052).

Bununla beraber, dondurulmuş koç sperması ile son yıllarda geliştirilmiş olan laparoskopi yardımıyla intrauterin tohumlama yöntemi uygulamalarından oldukça iyi sonuçlar alınmaktadır. Ancak bu tohumlama yönteminin büyük koyun sürüleri için pratik ve ucuz olmaması, uygulama zamanının uzun sürmesi ayrıca embriyonik ölümlere yol açması gibi olumsuzlukları vardır (2). Bu nedenle, araştırmacılar koça ait faktörlere yönelmiş, koç spermasını dondurma teknik ve yöntemleri üzerinde yoğunlaşmışlardır (29).

Kryoprezervasyon koç spermasının spermatozoa motilitesini düşürmesi yanında, spermatozoonun plazma membranı ve akrozom bütünlüğünün bozulmasına da yol açmaktadır. Son yıllarda doğal olarak epididymis ve seminal plazmada yüksek konsantrasyonlarda bulunan hypotaurin, inositol, prolin, askorbik asid, alfa-tokoferol, BHT, desferal, SOD, katalaz ve sulfonik bir amino asit olan taurin gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir (17). Antioksidan özelliği olan maddelerin in vitro koşullarda koç spermasının kısa ve uzun süreli saklanmasında lipid peroksidasyona karşı spermatozoa motilitesini ve spermatozoonun membran bütünlüğünü korumaktadır (6). Sanchez-Partida (21) farklı antioksidanlar katarak dondurdukları koç spermalarında çözündürme sonrası spermatozoa motilitesini, 50 mM taurin katılmış % 3-5 glyserol bulunduran Tris sulandırıcısıyla % 60'ın üzerinde bulduklarını söylemişlerdir. Uysal ve ark. (27) farklı antioksidanlarla dondurdukları koç spermalarından çözündürme sonrası en yüksek spermatozoa motilitesini (% 62.83) ve en düşük anormal spermatozoa oranını (% 15.83) ile ölü spermatozoa oranını (% 32.77) 50 mM taurin bulunduran Hapes sulandırıcısıyla elde etmişlerdir.

Koç spermasının dondurulmasında şimdilerde üzerinde en çok çalışılan konu sperma sulandırıcıları ve içerisine katılan antioksidan maddeler dışında, optimum dondurma protokolünün ortaya konmasıdır (4, 5). Koç spermasının dondurma ve çözündürme işlemlerine karşı dayanıklılığı bireyler arasında ve ırka bağlı farklılıklar göstermektedir (10).

Anel ve ark. (1) koç spermalarını klasik yöntem olan sıvı azot buharında ve programlanabilir cihazla (-0.2° C/ dakika soğutma hızı ile 5° C'dan -20° C'a ve -20° C/dakika soğutma hızı ile -20° C'dan -100° C'a) olmak üzere iki yöntemle dondurmuşlar ve en yüksek spermatozoa motilitesi ve plazma membran bütünlüğünü soğutma hızının programlanmasıyla elde ettiklerini söylemişlerdir.

Byrne ve ark. (3) ise 5° C/dakika soğutma hızı ile 5° C'dan -25° C'a (hızlı) ve 0.5° C/dakika soğutma hızı ile 5° C'dan -25° C'a (yavaş) soğutarak dondurdukları koç spermalarında in vivo ve in vitro fertilizasyon sonuçlarına göre hızlı dondurma protokolü ile yavaş dondurma yönteminden önemli ölçüde daha yüksek dölverimi aldıklarını söylemişlerdir.

Çalışmada koç spermalarının dondurulması/çözündürülmesi sonrası kimi spermatolojik değerler üzerine sperma sulandırıcısına katılan farklı dozlarda antioksidan (taurin) ile değişik hızlarda soğutmanın ve ırk etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

Araştırmada kullanılan spermalar Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama çiftliğinde bulunan Akkaraman, Sakız ve Ramlıç ırkı üç baş koçtan alınmıştır. Koçlar Fakülte çiftliği koşullarında tutulmuş, bakım ve beslenmeleri buldukları sürü içinde yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan ejakülatlar, sağlıklı ve normospermi özelliği gösteren koçlardan sun'i vajen yardımıyla haftada iki kez alınmıştır. Elde edilen ejakülatlarda başlıca spermatolojik özellikler (ejakülat miktarı, spermatozoa motilitesi, spermatozoa yoğunluğu, anormal spermatozoa, ölü spermatozoa, spermanın pH değeri) belirlenmiştir.

Spermaların dondurulmasında tris-sitrat-fruktoz sulandırıcısı (30) kullanılmıştır. Kryoprotektan etki % 4 gliserol ile antioksidan etki ise her sulandırıcı grubu için 20 mM, 50 mM, 80 mM taurin ile sağlanmıştır. Böylece, biri kontrol üçü antioksidanlı olmak üzere toplam dört grup oluşturulmuştur. Dondurulacak ejakülatlar birleştirilerek (miks ejakülat), homojen karışımdan her üç antioksidan ve kontrol grubu için spermalar split ejakülat biçiminde kullanılmıştır.

Spermaların sulandırma, dozlama (400x10<sup>6</sup>/ml) ve alıştırma işlemleri (2.5 saat) 5-6°C lik ortamda gerçekleştirildikten sonra, dondurulacak spermalar 0.25 ml'lik payetlere çekilmiş ve dondurma süresi ve sıcaklığı ayarlanabilen sıvı azotla çalışan otomatik programlanabilir aletle dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Dondurma işleminde her antioksidan grubu için üç farklı dondurma prosedürü uygulanmıştır:

1. Dondurma protokolü:  
8 dakikada -120°C (15°C/dakika);
2. Dondurma protokolü:  
12 dakikada -120°C (10°C/dakika);
3. Dondurma protokolü:  
24 dakikada -120°C (5°C/dakika)

olarak belirlenmiştir.

Dondurma işlemi tamamlandıktan sonra payetler sıvı azot içinde (-196°C) depolanmıştır.

Dondurulmadan önce (alışım sonrası) spermatozoa motilitesi değerlendirilen ve dondurularak sıvı azotta saklanan spermalar su banyosunda 40°C de ve 10 saniye içinde çözündürülmüştür. Çözündürme sonrası spermalarda spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa, ve ölü spermatozoa değerlendirmeleri yapılmıştır.

Araştırmada, her antioksidan grubu ve dondurma prosedürleri için elde edilen bulgular karşılaştırmalı olarak değerlendirilerek, istatistiki önemleri Kruskal Wallis ve ANOVA testleri ile ortaya konmuştur.

### Bulgular

Araştırmada spermaları alınan üç koçun ejakülatlarında değerlendirilen başlıca spermatolojik özelliklere ilişkin değerler Tablo 1’de verilmiştir. Her üç koçun ejakülat miktarı, spermatozoa motilitesi, spermatozoa yoğunluğu, anormal spermatozoa oranı, ölü spermatozoa oranı ve spermanın pH değeri normal sınırlar içinde bulunmuştur. Bununla beraber ejakülat miktarı, spermatozoa yoğunluğu ve anormal spermatozoa oranı yönüyle koçlar arasında istatistik olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir.

Farklı antioksidan konsantrasyonlarıyla dondurulmuş koç spermalarında alışım ve çözündürme sonrası kimi spermatolojik değerler Tablo 2’de sunulmuştur. Alışım

sonrası spermatozoa motilitesi, çözündürme sonrası spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı yönüyle farklı taurin konsantrasyonları ve kontrol grubu arasında istatistik yönden farklılık saptanmamıştır. Ancak 20 mM taurinle dondurulmuş koç spermalarında alışım ve çözündürme sonrası değerlendirilen spermatolojik özelliklerin diğer gruplara göre daha yüksek ve uygun değerler gösterdiği gözlenmiştir.

Tablo 3’de farklı soğutma hızlarıyla dondurulmuş koç spermalarında çözündürme sonrası kimi spermatolojik değerler görülmektedir. Bu çalışmada farklı soğutma hızlarının çözündürme sonrası spermatolojik değerler üzerine etkileri yönüyle istatistik açıdan bulunan farklılıklar önemsiz olarak kaydedilmiştir. Ancak II. dondurma pro-

Tablo 1 : Nativ koç ejakülatlarında başlıca spermatolojik özelliklere ilişkin değerler (n=10).

Table 1 : Values regarding principal spermatological characteristics in fresh semen

Koç	Ejekülat miktarı(ml) x±sx	Spermatozoa motilitesi(%) x±sx	Spermatozoa yoğunluğu(x10 <sup>9</sup> ) x±sx	Anormal spermatozoa oranı (%) x±sx	Ölü spermatozoa oranı (%) x±sx	pH x±sx
Akkaraman	1.04±0.2 a	70.5±13.8	2.7±0.20 a	16.5±7.9 a	17.6±6.2	6.5±0.2
Sakız	1.5±0.4 b	75.0±11.8	3.1±0.5 b	5.8±1.25 b	14.3±5.4	6.6±0.2
Ramlıç	1.3±0.4 b	75.0±14.3	3.2±0.4 c	9.5±4.2 c	16.8±7.5	6.5±0.2
ÖD	p <0.05	p >0.05	P <0.01	P <0.001	p >0.05	p >0.05

a,b,c: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli

Tablo 2. Farklı dozlarda antioksidan içeren koç spermalarında alışım ve çözündürme sonrası kimi spermatolojik değerler (n=15).

Table 2 : Post-equilibration and post-thawing some spermatological characteristics in ram semen containing different antioxidant doses

Antioksidan (Taurin) mM	Alışım sonrası		Çözündürme sonrası	
	Spermatozoa motilitesi(%) x±sx	Spermatozoa motilitesi (%) x±sx	Anormal spermatozoa oranı(%) x±sx	Ölü spermatozoa oranı(%) x±sx
20	64.3±14.7	38.7±9.4	18.7±4.9	52.2±9.2
50	60.0±15.5	31.1±16.4	18.4±4.8	60.3±14.1
80	57.0±12.5	26.5±15.0	17.0±4.6	61.5±16.9
Kontrol	60.7±16.8	34.4±10.1	19.0±6.9	54.7±12.4
ÖD	p >0.05	p >0.05	p >0.05	p >0.05

Tablo 3 : Farklı soğutma hızları ile dondurulan koç spermalarında çözündürme sonrası kimi spermatolojik değerler (n=15).

Table 3 : Post-thawing some spermatological characteristics in ram semen frozen by different cooling rate

Soğutma hızı	Çözündürme sonrası		
	Spermatozoa motilitesi(%) x±sx	Anormal spermatozoa oranı(%) x±sx	Ölü spermatozoa oranı(%) x±sx
I - 15 °C/dk	30.0±11.0	17.7±4.3	62.0±14.1
II - 10 °C/dk	33.1±13.5	17.7±4.6	54.0±13.8
III - 5 °C/dk	32.0±18.0	23.0±17.0	56.8±20.2
ÖD	p >0.05	p >0.05	p >0.05

Tablo 4: Farklı ırktan koç spermalarının dondurulması/çözdürülmesi sonrası kimi spermatolojik değerler (n=20).  
Table 4 : Some spermatological characteristics after freezing/thawing of ram semen from different breed.

Koç ırkı	Alışım sonrası		Çözdürme sonrası	
	Spermatozoa motilitesi(%) x±sx	Spermatozoa motilitesi(%) x±sx	Anormal spermatozoa oranı(%) x±sx	Ölü spermatozoa oranı(%) x±sx
Akkaraman	48.0±15.1 a	23.4±13.8 a	15.4±2.6 a	60.7±14.6
Sakız	64.2±12.0 b	37.9±11.7 b	21.1±5.2 a	53.8±11.4
Ramlıç	69.2±7.1 b	32.8±13.1 b	18.3±6.0 ab	51.7±13.5
ÖD	P<0.001	P<0.01	P<0.01	p>0.05

a, b, ab : Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli

tokolünün çözdürme sonrası kimi spermatolojik özellikler üzerine diğerlerinden daha olumlu etki yaptığı görülmektedir.

Akkaraman, Sakız ve Ramlıç olmak üzere farklı ırktan dondurulmuş koç spermalarının alışım ve çözdürme sonrası kimi spermatolojik değerleri de Tablo 4'de verilmiştir. Bu çalışmada, alışım sonrası spermatozoa motilitesi, çözdürme sonrası spermatozoa motilitesi ve anormal spermatozoa değerleri yönüyle koç ırkları arasında istatistik olarak önemli farklılıklar bulunmuştur.

### Tartışma ve Sonuç

Sunulan çalışmada saptanan başlıca spermatolojik özelliklere ilişkin değerler büyük ölçüde fizyolojik sınırlar içinde kalmıştır. Ortalama spermatolojik değerlerdeki farklılıklar araştırmacıların değişik ırk ve genetik yapılarıdaki koçlarda çalışmalarından kaynaklanabildiği gibi, bireysel faktörler, farklı sperma alma ve değerlendirme tekniği ya da aşım mevsimi veya mevsim dışı sperma alımlarından ileri gelebilir (8, 13, 22, 25).

Nitekim bu çalışmada, istatistiksel açıdan koç ırkları arasındaki farklılıkların ejakülat miktarı, spermatozoa yoğunluğu ve anormal spermatozoa oranı yönüyle önemli ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ) olduğu kaydedilmiştir (Tablo 1).

Koç spermasının dondurulmasında günümüze kadar birçok sulandırıcı denenmişse de henüz istenen başarıya ulaşılamamıştır. Üstelik sulandırıcılara katılan glyserol, DMSO ve yumurta sarısı gibi kryoprotektanlar bile, koç spermasının dondurulmasında alışım ve çözdürme sonrası spermatozoa motilitesi ve plazma membranlarındaki hasarı dolayısıyla fertilitenin düşmesini önleyememektedir (18, 16).

Ancak son yıllarda seminal plazmanın da doğal olarak komponentleri olan taurin, hypotaurin, BSA, inositol, prolin, SOD, catalase, BHT, desferal, askorbik asit ve alfa-tokoferol gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir (19). Birçok araştırmacı (14, 24) sperma sulandırıcılarına bu antioksidan

maddelerden katarak dondurdukları koç spermalarında çözdürme sonrası spermatozoa motilitesinin yükseldiğini, akrozom bozukluklarının ve plazma membran hasarının azaldığını göstermişlerdir.

Sanchez-Partida ve ark. (21) sulandırıcıya farklı antioksidanlar katarak dondurdukları koç spermalarında çözdürme sonrası, 50 mM taurin katılmış %3-5 glyserol içeren Tris sulandırıcısıyla % 60'ın üzerinde spermatozoa motilitesi bulduklarını söylemişlerdir.

Sulandırıcıda antioksidanların kullanılması kryoprotektanların daha düşük konsantrasyonlarda kullanılmasını sağlamaktadır (12). Antioksidan bileşiklerin aynı zamanda kryoprotektan özelliklerinin de olması, bu maddelerle dondurulan spermalardan daha iyi sonuç alınmasını sağlamaktadır (9). Ayrıca hayvan türüne bağlı olarak spermanın dondurulmasında değişik antioksidan ihtiyaçları belirlenmesi yanında, aynı hayvan türünde spermatozoonların gereksinim duyduğu antioksidan konsantrasyonu da değişmektedir (17).

Uysal ve ark. (27) 10 mM vitamin C veya 50 mM taurin içeren Tris ve Hepes sulandırıcılarıyla dondurdukları Akkaraman ırkı koçlardan çözdürme sonrası en iyi sonuçları hepes+taurine elde etmişlerdir.

Sanchez-Partida ve ark. (21) koç spermasının dondurulmasında 100 mM ve üzeri konsantrasyonlarda kullanılan taurinin daha düşük dozlarının tersine spermatozoa motilitesini önemli ölçüde düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, farklı oranlarda taurin konsantrasyonlarıyla dondurulan koç spermalarında alışım ve çözdürme sonrası kimi spermatolojik değerler yönüyle gözlenen farklılıklar önemsiz ( $P>0.05$ ) bulunurken, en iyi sonuçların 20 mM taurine elde edildiği görülmektedir (Tablo 2).

Spermanın dondurulması işlemi uzun yıllar, kryoprotektan mediumlarla sulandırılan spermanın payetlere çekilmesi, ekilibrasyona bırakılması işlemlerinden sonra sıvı azot buharında ( $-120^{\circ}$  C) 15 dakikada dondurularak yapılmıştır. Ancak, spermanın dondurulmasında soğutma

hızı önemlidir, çünkü hızlı dondurma hücre içinde mekanik hasara neden olan büyük buz kristallerinin oluşmasına yol açar. Bunu yanında, yavaş dondurma buz kristal formasyonunu önler ancak, spermatozoonlar kryoprotektanlı mediumun etkisinde ve ozmotik dengersizlikte daha uzun süre kalırlar. Bu nedenle, spermatozoonlar ve ekstrasellüler çevre arasında bir ekilibriumun sağlanabilmesi için hayvan türüne özgü bir optimum soğutma hızının belirlenmesi gerekmektedir (11, 28).

Son yıllarda, soğutma hızı kontrol edilebilen programlanabilir gamet dondurma cihazlarının kullanılmaya başlanmasıyla, araştırmacılar hayvan türleri için en uygun dondurma programları üzerinde odaklanmışlardır (7, 30). Koç spermasının dondurulmasında da koç spermatozoonlarının en duyarlı olduğu ve buz kristal formasyonunun meydana geldiği sıcaklık aralığı üzerinde (-10 ile -25° C) araştırmalar sürdürülmektedir (20).

Kumar ve ark. (10) trisle sulandırılmış koç spermalarının kontrollü dondurma cihazında -5° C/dakika hızda -5° C'a soğutup seeding yaptıktan sonra -1° C, -30° C veya -50° C/dakika olmak üzere üç farklı hızda -50° C'a soğutarak dondurmuşlar ve sıvı azota daldırmışlardır. 40° C'da 30 saniyede çözdürlen spermalardan elde edilen sonuçlara göre kryoprezervasyonun spermatozoonlar üzerine neden olduğu hasarı minimuma indirmek için optimal soğutma hızının -30° C olduğunu ifade etmişlerdir.

O'Neill (15) ise spermatozoa canlılığı, mitokondrial aktivite ve akrozom bütünlüğü yönüyle 5° C'dan -25° C'a, -5° C/dakika soğutma hızından elde edilen değerlerin -0.5° C/dakikadakinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ifade etmiştir.

Bu çalışmada ise, çözdürme sonrası değerlendirilen spermatozojik özelliklerden spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı yönüyle dondurma hızları arasında gözlenen farklılıklar önemsiz ( $p>0.05$ ) olmasına rağmen, II. dondurma protokolü olan 10° C/dakikada soğutma hızında daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Söz konusu çalışma ile diğer çalışmalar arasında gözlenen farklılıklar, bu çalışmanın aksine (5° C'dan -120° C'a), birçok araştırmacının (10, 15) spermayı 5° C'dan en düşük -50° C'a kadar soğutmaları ve sıvı azotta saklamalarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, alışım ve çözdürme sonrası spermatozojik özellikler değerlendirildiğinde, farklı koç ırklarında spermanın dondurulabilirliğinin de değiştiği, hatta alışım sonrası spermatozoa motilitesi, çözdürme sonrası spermatozoa motilitesi ve anormal spermatozoa oranı yönüyle koç ırkları arasında istatistikî açıdan önemli ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ) farklılıklar saptanmıştır.

Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, koç spermasının dondurulmasında değişik taurin dozlarının ve dondurma hızlarının çözdürme sonrası başlıca spermatozojik parametrelerde farklı değerler göstermesine rağmen, söz

konusu rakamlar istatistiksel değerlendirmede önemli bulunmamıştır.

### Kaynaklar

1. Anel L, Paz P, Álvarez M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, González M, Kaabi M Anel E (2003): *Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen*. Theriogenology, **60**, 1293-1308.
2. Ayar A, Akdeniz C (1995): *Ankara keçilerinde dondurulmuş sperma kullanılarak intrauterin ve intraservikal tohumlama uygulamaları*. Lalahan Hay Araş Ens Derg, **35**, 79-86.
3. Byrne GP, Lonergan P, Wade MJ, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP (2000): *Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro*. Anim Reprod Sci, **62**, 265-275.
4. Curry MR (2000): *Cryopreservation of semen from domestic livestock*. Revs Reprod **5**, 46-52.
5. Curry MR, Millar JD, Watson PF (1994): *Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical results*. Biol. Reprod. **51**,1014-1021.
6. Dziuk PT, Lewis JM, Graham EF, Moyer RH (1972): *Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen sperm at an appointed time in the ewe*. J Anim Sci, **35**, 572-575.
7. Fiser PS, Fairfull RW (1984): *The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws*. Cryobiology, **21**, 542-551.
8. Fitzgerald JA, Stellflug JN (1991): *Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams*. J Anim Sci, **69**, 264-275.
9. Kobayashi T, Miyasaki T, Natori M, Nozawa S, (1991): *Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxidase in human seminal plasma and spermatozoa*. Hum Reprod, **6**, 987-991.
10. Kumar S, Millar JD, Watson PF (2003): *The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines*. Cryobiology, **46**, 246-253.
11. Mazur P (1990): *Equilibrium, quasi-equilibrium, and non-equilibrium freezing of mammalian embryos*. Cell Biophys **17**, 53-92.
12. Milovano, VK, Sokolovskaya II (1980): *Long-term storage of ram semen and new possibilities of large scale selection in sheep breeding*. Vestnik Selskok Nauki, **12**, 122-132.
13. Molinia FC, Evam G, Maxwell WM (1996): *Fertility of ram spermatozoa pellet frozen in zwitterion buffered diluents*. Reprod Nutr Dev, **36**, 21-29.
14. Ola, TT, Bowen RA, Pickett BW (1989): *Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws*. Theriogenology, **31**, 451-461.
15. O'Neill DJ (1998): *Studies on the Cryopreservation of Ram Spermatozoa*. MSc(Agr.) Thesis, National University of Ireland.
16. Öztürkler Y, Ak K, İleri İK (1999): *Koç spermasının yoğun gliserollü sulandırıcılarda dondurulması*. Istanbul Univ Vet Fak Derg, **25**, 339-414.

17. **Pomares CC, Stojanov T, Eppleton J, Maxwell WMC** (1996): *Effect of glutathion peroxidase on the survival of the goat and ram spermatozoa during liquid storage.* Proc 7 th. Int Symp Spermatoz Abstr, **9**, 24-28.
18. **Pontbriand D, Howard JG, Schiewe MC, Stuart LD, Widt DE** (1989): *Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa.* Cryobiology, **26**, 341-354.
19. **Risopatroni J, Catalan S, Miska W, Schill WB, Sanchez R** (2002): *Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated in vitro.* Reprod Domest Anim, **37**, 347-351.
20. **Salamon S, Maxwell WMC** (1995): *Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination.* Anim Reprod Sci **37**, pp, 185-249.
21. **Sanchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell MC** (1997): *Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa.* Reprod Fertil Dev, **9**, 689-696.
22. **Sevinç A, Tekin, N, Yurdaydın N, Kale N** (1985): *Çifteler harası tiftik tekelerinin başlıca spermatolojik özellikleri üzerine araştırmalar.* Doğa Bil Derg, **9**, 264-273.
23. **Sirivaidyapong S, Ursemi P, Bevers MM, Colenbrander B** (2001): *Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa.* J. Reprod Fertil Suppl, **57**, 383-386.
24. **Tekin N** (2000): *Yetiştiricilikte sun' i tohumlamanın önemi.* Türkiye-2000 Hayvancılık Kongresi, 57-64, Kızılcahamam, Ankara.
25. **Tekin N, Günzel AR** (1986): *Koç spermasının değişik sulandırıcılarda dondurulması ve in vitro değerlendirme yöntemleri üzerinde araştırmalar.* Ankara Üniv Vet Fak Derg, **33**, 381-393.
26. **T. C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü** (2002): *Türkiye İstatistik Yıllığı.* 294.
27. **Uysal O, Kinet H, Çevik M, Çetinkaya S** ( 2000): *Değişik antioksidanlar içeren farklı sulandırıcılarda dondurulmuş koç spermalarından elde edilen dölverimi.* Ankara Üniv Vet Fak Derg, **47**, 177-189.
28. **Watson PF** (1990): *Artificial insemination and the preservation of semen.* In: G.E. Lammung, Editor, (fourth ed.), Marshall's Physiology of Reproduction, Churchill Livingstone, London, pp. 747-869.
29. **Windsor PP, Szell AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton TTB, Buchrell BC** (1994): *Transcervical artificial insemination of Western Australian Merino ewes with frozen-thawed semen.* Theriogenology, **42**, 147-157.
30. **Yu IC, Songsasen N, Godke RA, Leibo SP** (2002): *Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates.* Cryobiology, **44**, 62-78.

Geliş tarihi: 16.11.2005 / Kabul tarihi: 19.12.2005

**Yazışma adresi:**

Prof. Dr. Necmettin Tekin  
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Dölerme ve Sun' i Tohumlama Anabilim dalı,  
06110, Dışkapı, Ankara.  
e-mail: ntekin@veterinary.ankara.edu.tr.