



## Teke Spermasının Kriyokonservasyonu ve Uygun Yöntem Kullanımı

Coşkun KONYALI

ÇOMÜ, Lapseki Meslek Yüksekokulu, 17800, Çanakkale

Sorumlu yazar: ckonyali@comu.edu.tr

### Özet

Kriyokonservasyon, üreme biyoteknolojisi, ıslah ve genetik kaynakların korunma ve muhafazası gibi birçok alanda önemli fayda sağlamaktadır. Uygun kriyokonservasyon yöntemleri sayesinde üremede başarı artırılabilir. Özellikle keçiler gibi mevsime bağlı üreme yapısına sahip türlerde kriyokonservasyon büyük avantaj sağlamaktadır. Türlerimize göre üreme biyoteknolojilerinin geliştirilmesi, sahip oldukları biyolojik farklılıkların bir sonucu olup, dondurma çözündürme sonrası hayatta kalma oranı türlerimize göre önemli farklılık göstermektedir. Sperma membranının lipid ve protein gibi kompozisyonunu oluşturan bileşenlerin çözündürme sonrası kalite üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Teke spermasının özelliklerinin belirlenerek uygun semen alımı, değerlendirilmesi işlemleri ile dondurma protokollerinin geliştirilmesi üreme performansını artırıcı önemli unsurlar olup, yapay tohumlama ya da diğer in vitro – in vivo çalışmalarda spermin kullanılabilirliğini etkilemektedir. Kriyokonservasyonun zararlı ve öldürücü etkisinin azaltılması dondurma çözündürme sonrası sperm kalitesi üzerinde doğrudan etkilidir. Dondurmada kullanılan çözelti ve biyolojik ortamların iyileştirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda tekelerde semen alımı, işlenmesi, kriyokonservasyonu ve çözündürme süreçlerini kapsayan protokollerin maliyet, iş gücü ve zaman tasarrufu da sağlayarak uygun sperm analiz yöntemlerinin oluşturulması gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Casa, kolesterol, siklodekstrin, sperm analiz, sperm kalite, üreme

## Crioconservation of Buck Sperm and Using of Appropriate Method

### Abstract

Cryoconservation provides significant benefits in many areas such as reproductive biotechnology, breeding and protection and conservation of genetic resources. Thanks to appropriate cryoconservation methods, success in reproduction can be increased. Cryoconservation provides a great advantage especially in species with seasonal reproductive structure such as goats. The development of reproductive biotechnology by species is a result of their biological differences, and the survival rate after freezing thawing varies significantly according to species. It is known that the components that make up the composition of the sperm membrane such as lipid and protein are effective on the quality after thawing. Determining the characteristics of buck semen and developing appropriate semen collection, evaluation and freezing protocols are important factors that increase reproductive performance and affect the availability of sperm in artificial insemination or other in vitro - in vivo studies. Reducing the detrimental and lethal effect of cryoconservation has a direct effect on sperm quality after freezing and thawing. The solution and biological environments used in crioconservative diluents need to be improved. In this context, protocols covering semen collection, processing, cryoconservation and thawing processes in bucks should be established, and appropriate sperm analysis methods should be used by saving cost, labor and time.

**Keywords:** CASA, cholesterol, cyclodextrin, sperm analysis, sperm quality, reproduction

## **Giriş**

Yapay tohumlama 1780 yılından beri uygulanması akabinde (Herman ve ark., 1994) hayvan biliminin birçok alanında olduğu gibi üreme biyoteknolojisinde de önemli gelişimlere katkı sağlamıştır. Genetik materyalin yayılmasında ve ıslah programlarının uygulanmasında temel araç olan yapay tohumlama uygulamalarında erkek damızlıklardan alınan semenlerin kullanımınıdır. Genetik ilerlemenin sağlanması ve döl verimliliği açısından kaliteli üreme materyali karlı ve sürdürülebilir bir hayvansal üretim için büyük önem arz etmektedir. Yapay tohumlama uygulamasıyla birlikte erkek üreme hücrelerinin canlı dışındaki çevrede muhafazası ve kullanımı temel unsurlardan biri olmuştur. Elde edildikten sonra semenin maruz kaldığı çevre doğrudan semen kalitesini ve bu da yapay tohumlama gibi uygulamaların başarısını etkilemektedir. Döllenme olasılığının artırılmasında kaliteli ve canlı spermanın dişi üreme kanalındaki hayatta kalabilirliği ve yumurtaya ulaşarak dölleme yeteneğinde olması gerekir. Spermanın uzun süre muhafazasının sağlanmasında kriyokonservasyon teknikleri uygulanmaktadır. Genetik materyalin yıllarca saklanması ve muhafazası gibi çok önemli bir fayda sağlayan kriyokonservasyon beraberinde çok da önemli bir sorunu getirmiştir. Üreme hücrelerinin dondurup çözündürme aşamasını da içeren süreç, bu hücreler üzerinde öldürücü etkiye sahip olabilmekte, dölleme yeteneklerini önemli derece düşürebilmektedir. Semen alımından işlenip tohumlamada kullanana değin geçen süreç biyoteknolojik uygulamalar ile iyileştirilmeye çalışılmakta, farklı protokoller ve in vivo ya da in vitro dölleme yöntemleri kullanılmaktadır. Semen uygun yöntemlerle erkeklerden alınması sayesinde bir ejakulat ile çok sayıda dişi dölleme imkanı elde edilmekte, aynı zamanda istenen genetik özelliklerin daha hızlı bir şekilde yayılmasına imkan sağlamaktadır.

Yapay tohumlamanın başarısı bakımından türlere göre önemli varyasyon bulunmaktadır. Sığır ile kıyaslandığında daha düşük başarı oranına sahip keçi yetiştiriciliğinde de günümüzde uygulanan yöntemler ve protokoller ile başarı arttırılmaya çalışılmaktadır. Sığırla kıyaslandığında nispeten daha yeni kriyokonservasyon ve yapay dölleme uygulamalarına sahip keçilerde semen alım, işleme, katkı maddeleri ve dondurma-çözündürme süreçleri ile analiz işlemleri söz konusu seviyenin yukarılarına çıkarılmasını sağlayacaktır. Günümüzde mikroskobik düzeyde yapılan semen analizlerinde hareketlilik, morfoanomalileri ve akrozom yapıları gibi parametreler ile bunların döl verimliliği ile ilişkilendirilmesi gerçekleştirilmektedir. Dondurma işlemi neticesinde spermatozoidlerin söz konusu parametreler bakımından birtakım hasarlara uğradığı belirtilmektedir (Curry, 2000; Holt, 2000).

Sperma plazmatik membranının kolesterol:fosfolipid oranının, spermatozoidlerin sıcaklık düşmesine olan direncini etkilediği ve bu oranın yüksek olduğu insan ve tavşan türlerine ait spermatozoidlerin soğuk şokuna daha dirençli olduğu belirtilmektedir (Watson, 1981; Parks ve Lynch, 1992; White, 1993). Teke spermatozoidlerinin işleme ve dondurma protokolunun araştırılmasının dondurma-çözündürme işlemi sonrasında ele alınan parametreler bakımından iyileştirme sağlama açısından önemli olacağı öngörülmektedir. Kriyokonservasyonda başarı ve sperm kalitesinin artırılması uygulanabilir protokollerin oluşturulması ile mümkün olacaktır.

## **Semen Alımının Önemi**

Günümüzde üreme biyoteknolojisi konusunda çok önemli aşamalar kat edilmiştir. 1780'li yıllarda başladığı belirtilen (Herman ve ark.,1994) suni tohumlama uygulaması başta olmak üzere, genetik materyalin gelecek nesillere aktarımı ve yayılmasında biyoteknolojik çalışmalar birçok alanda uygulanmaktadır. Islah çalışmaları ve genetik sürecin hızlandırılması, nesli tükenme tehlikesi altında olan canlıların üreme hücreleri üzerine çalışmalar, üreme kusurları ve/veya bozukluklarına sahip bireylerin üreme çalışmaları, ileri düzey laboratuvar çalışmaları gibi alanlarda ve konularda üreme biyoteknolojik çalışmaları gerçekleştirilmektedir.

Erkek bireylerden alınan erkek üreme hücreleri suni tohumlama uygulamaları yanında, spermatozoitlerin in vitro – in vivo değerlendirilmeleri ve kullanılmalarının gerçekleştirilmesini mümkün kılmıştır. Örneğin erkek bireylerden alınan spermatozotlerin cinsiyetlerinin belirlenerek kullanılması, üremenin biyolojik etkinliğinin artırılması ile ıslah programlarına ışık tutulması gibi birçok yarar sağlamaktadır. Erkek bireylerden alınan semen aracılığıyla in vitro fekundasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi sonucunda in vitro embriyo çalışmaları gerçekleştirilmektedir.

### **Sperm Üretimi ve Alım Yöntemleri**

Genç tekelerde seksüel davranışın başlaması, doğumdan itibaren birkaç hafta içinde (Avrupa ırkları) olabileceği gibi 1 yıllık yaşa (Şam keçi ırkı) kadar bir vasyasyon gözükmemektedir (Leboeuf ve ark., 2000). Ergin erkeklerde doğrudan hormonal ve sosyal olaylar tarafından etkilenen seksüel motivasyon ve etkinlik bakımından belli bir sürünün erkekleri arasında da farklılık bulunmaktadır. Bu bağlamda seksüel davranış ve etkinlik ile sperm üretiminin beslenme, yaş, sağlık durumu, hiyerarşik düzen, konfor durumu, mevsim, dişi etkisi, çevre sıcaklığı gibi bazı faktörlerden etkilendiğini söyleyebiliriz. Rouger, (1974) kızgın olan dişilerin besin durumu ve sezon gibi birtakım faktörlerin interaksiyonu bütününde birlikte erkeklerin cinsel davranışları üzerinde önemli etkisinin olduğunu belirtmiştir.

Tekelerde sperm üretimi konusunda çok az çalışma olmasıyla birlikte testis başına günlük sperm üretiminin  $2,76$  ile  $7,23 \times 10^9$  arasında değiştiği bildirilmektedir (Derashri ve ark., 1992; Walkden-Brown ve ark., 1994). Yoğun alımdan tahmin edilen günlük sperm çıkışı daima günlük sperm üretiminin % 40-80' i civarındadır (Leboeuf ve ark., 2000). Alpin ve Poitevine ırklarında semen hacimlerinin kış ve sonbahar aylarında ve üreme sezonu boyunca yüksek olduğu; ilkbahar, yazın ve üreme dışı sezonda giderek azaldığı bildirilmektedir (Leboeuf ve ark., 2000). Sperm yoğunluğu ise bunun tersi bir yönelim izlemektedir (Corteel, 1977).

Spermatozoit kalitesinin mevsimden önemli derecede etkilendiği bildirilmektedir. Hareketli spermatozoit yüzdesinin üreme sezonu boyunca daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Delgadillo, 1990). Üreme dışı sezonda, seyreltilmiş sperm hareketliliğinin birkaç hafta için düşük değerlerde olduğu, fakat bu sürenin yıl ve erkek bakımından farklılık gösterdiği Corteel, (1977) tarafından bildirilmiştir. Sperm morfolojik anomalilerinin yüzdelerinde az mevsimsel varyasyon görüldüğü bildirilmektedir. Üreme sezonunda % 5-8 olan morfolojik anomalilerin, diğer zamanlarda % 10-18 civarında olduğu tespit edilmiştir (Corteel, 1977; Delgadillo, 1990; Tuli ve Holtz, 1992.)

Canlı hayvanlardan yapay vagina ve elektrojekulasyon metodları ile semen alınabildiği gibi, ölmüş hayvanların epididimislerinden de semenlerin alınması mümkündür (Şekil 1; Şekil 2). Söz konusu yöntemlerden en yaygın ve etkin kullanılanı yapay vagina yöntemidir. Yapay vagina yöntemi, tüm semenin kolay ve temiz bir şekilde alınmasına, erkeklerde strese neden olmadığı ve basit bir yöntem olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Tekelerde kullanılan yapay vagina yaklaşık 17cm uzunluğunda olması, sıcaklığının  $43-46$  °C arasında olması gerekmektedir. Bu yöntemin uygulanmasında dikkat edilmesi gereken ise erkeklerin antremanlı olmaları gerekmektedir.

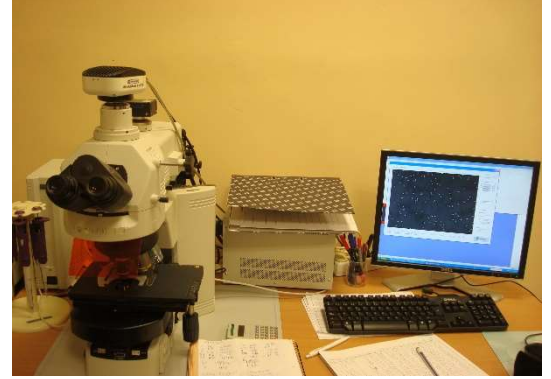


## Teke Spermasının Kriyokonservasyonu ve Uygun Yöntem Kullanımı

Semen konsantrasyonu mililitrede bulunan spermatozoid sayısını veren bir parametredir. Semen karakterine göre değişken olduğu ve suni tohumlamada kullanılacak olan spermatozoid sayısının ayarlanabilmesi için önemlidir. Manuel olarak hemositometre ile tespit edilebileceği gibi elektronik hücre sayıcılar, spektrofotometre veya renkmetre, ile semen analiz bilgisayar programları (CASA) ile otomatik olarak tespit edilebilmektedir (Şekil 4; Şekil 5).



Şekil 4. Spektrofotometre



Şekil 5. Bilgisayar destekli sperm analiz sistemi (CASA)

Diğer bir önemli parametre sperma hareketliliğidir. Dişi üreme kanalına dahil olan spermatozoitlerin döllenmeyi gerçekleştirebilmeleri için en kısa süre içerisinde yumurtaya doğru hareket etmeleri gerekmektedir. Sperm motilitesi semen kalitesi için önemli bir parametredir ve döllenme ve diğer semen kalitesi özellikleri ile yakından ilişkilidir. Sperm motilitesi ve fertilité arasında korelasyon (0,15-0,84; Rodríguez-Martínez, 2006; Graham, 2001) ve sperm canlılığı ve fertilité arasındaki korelasyon (0,33-0,66; Graham, 2001) çalışmalara göre farklılık göstermektedir.

### İÇSEL FAKTÖRLER

- Yaş
- Sperm Olgunlaşması
- Etkin Ajanlar
- Enerji Stoğu

### DIŞSAL FAKTÖRLER

- Maruz Kalınan Sıvılar
- Uyarıcı ve Engelleyiciler
- Biyofiziksel ve Fiziksel Faktörler

Şekil 6. Sperm hareketliliğini etkileyen içsel ve dışsal faktörler

Hareketlilik döllenme için esansiyeldir. Fakat buna rağmen sağlıklı bir spermatozoidin özelliği olan hareketlilik yalnızca dölleme kapasitesini belirlemez (Hafez, 1993). Normal bir spermatozoid hareketlilik yeteneğini kaybetmeden önce dölleme yeteneğini kaybedebilir. Bazı içsel ve dışsal faktörler sperm hareketliliğine etki edebilmektedirler. Sperm motilitesinin değerlendirilmesinde hareket karakteristikleri de önemlidir ve in vivo dölleme ile bu karakteristikler yakından ilişkilidir (Januskauskas ve ark., 2000).

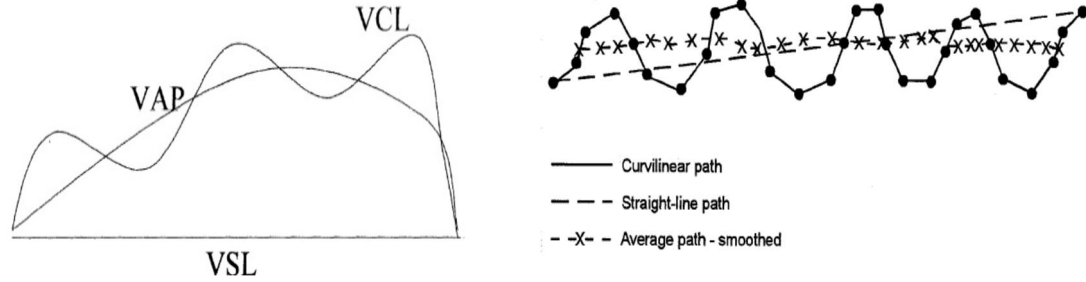
Spermatozid hareketliliği subjektif, bilgisayar programları ve diğer (servikal mukus) yöntemler yardımıyla tespit edilebilmektedir. Subjektif mikroskopik değerlendirme kullanıldığında, aynı semenin hareketlilik parametreleri tahmininde %30-60'a varan varyasyonlar rapor edilmiştir (Verstegen ve ark., 2002). Bu varyasyonun üstesinden gelmede en yaygın kullanılan sistem 'CASA' (Computer-assisted semen analysis) olarak adlandırılan Dott ve Foster tarafından tasarlanan bilgisayar sistemidir. Çizelge 1

## Teke Spermasının Kriyokonservasyonu ve Uygun Yöntem Kullanımı

ve Şekil 7’de CASA programında ele alınan motilite parametreleri yer almaktadır. CASA spermatozoid hareketliliğinin objektif olarak tahmin edilmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda örnekteki spermatozoidlerin hareket kalitelerinin, yörüngelerinin ve hızlarının % olarak elde edilmesini sağlamaktadır. Sperm motilite özelliklerinin değerlendirilmesi, semen örneklerinin in vivo veya in vitro fertilizasyon yeteneğini değerlendirmek için önemlidir (Çizelge 1.). CASA sistemi tarafından değerlendirilen motilite, birçok sperm hareket kriterinin tekrarlanabilir tahminlerini sağlamıştır (Holt ve ark., 1994; Versteegen ve ark., 2002; Gillan ve ark., 2008).

Çizelge 1. CASA programında kullanılan parametreler (Versteegen ve ark., 2002).

VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	Eğri çizgisel hız
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	Doğrusal hız
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	Ortalama hız
LIN (%)	Doğrusallık katsayısı
STR (%)	Düzlük katsayısı
WOB %	Sallanım katsayısı
ALH ( $\mu\text{m}$ )	Lateral baş yer değiştirme genişliği ortalaması
BCF (hz)	Baş yer değiştirmenin sıklığı



Şekil 7. CASA programında kullanılan parametreler

Spermatozoidlerin morfolojik analizi, epididimiste olgunlaşma veya spermatogenezdeki problemler hakkında bilgi vermektedir. Yüksek oranda morfolojik anomalilerin görülmesi fertilite ve çoğuzluk oranlarının azalmasına neden olabilmektedir. Morfolojik anomaliler gametler arasındaki etkileşim bozukluklarına veya yaşama yeteneği olmayan embriyoların üretimine neden olmaktadır (Mocé, 2008). Spermatozoidlerin morfolojik anomalileri birincil, ikincil ve üçüncül anomaliler olarak sınıflanabilmektedir. Birincil spermatozoid anomalileri spermatogenezdeki bozukluktan kaynaklanmakta; ikincil anomaliler spermatozoidlerin epididimisteki geçirdiği süreçten kaynaklanmakta; ejakulasyon boyunca veya sonrasında işleme, muhafaza, suni tohumlama süreçlerinde meydana gelen sorunlar da üçüncül spermatozoid anomalileri olarak bildirilmektedir (Hafez, 1993). Söz konusu anomaliler genel olarak manuel olarak mikroskop ile yahut da özel boyalar kullanarak mikroskoplarda ışık kontrastlarını temelinde yahut da elektronik programlar ile gerçekleştirilmektedir. Şekil 8’de sperm morfolojik anomalileri yer almaktadır. Normal spermatozoidlerde 3 ana bölge (baş, orta kısım, kuyruk) kolaylıkla ayrılabilir. Kuyruksuz baş, kuyruk kıvrıklıkları, kısa ya da kopuk kuyruk, baş kısmında meydana gelen anomaliler (çok küçük yada büyük baş, başta uzama), çift kuyruk, orta kısımda boğum bulunması bu anomalilere örneklerdir.

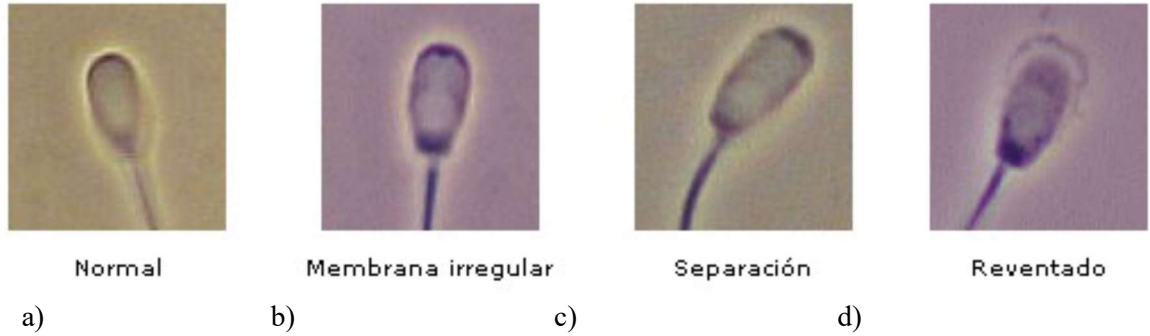
## Teke Spermasının Kriyokonservasyonu ve Uygun Yöntem Kullanımı



Şekil 8. Morfolojik anomaliler

Semenler %5'e yakın anormal spermatozoid içerebilmektedir ve %20-25 oranlarına varan anormal morfolojik yapıdaki spermatozoid oranının fertilitiyi etkilemediği bildirilmektedir (Bearden, 2000). Anormal morfolojik yapıya sahip spermatozoidler ilerleyen hareketliliği yapamamaktadır ve bu yüzden anormal spermatozoid sayısının artması durumunda ilerleyen hareket gösteren spermatozoid yüzdesi düşmektedir (Bearden, 2000).

Akrozom, çekirdeğin ön tarafta kalan kısmını çevreleyen, dölleme süresince zona pelucida ve corona radiataya spermanın penetrasyonu için gerekli enzimleri içeren kısımdır. Eğer akrozom kusurlu, hasarlı veya noksan olursa spermatozoid dölleyebilme yeteneğinde olmayacaktır (Bearden, 2000).



Şekil 9. Akrozom yapısı : (a) normal akrozom, (b) düzensiz membran, (c) bölünmüş, (d) açılmış akrozom

Akrozom yapısına dair normal ve diğer anomaliler Şekil 9'da yer almaktadır. Akrozom değerlendirmede faz kontrastlı mikroskop, interference kontrastlı mikroskop veya elektronik mikroskop ile tespit edilebilmektedir. Ejakülatta bulunan anormal yapıli spermatozoidlerin tespitinde Giemsa, eosina B-Fast green FCF; naftol, sarı ve eritrosin B gibi boyalar kullanılacağı gibi, florosanlar kullanılarak akım sitometrisi ile de analiz edilebilmektedir (Mocé, 2008).

Barth ve Oko (1989), morfoanomalilerin tolere edilebilecek oranlarını şöyle belirtmişlerdir:

- Çekirdeksel anomaliler : < %15-20. Dölleme ve embriyo gelişiminde olumsuz etkilere sahiptir.
- Spermatozoidlerin yumurtaları dölleyebilme kapasitesinde olmamasına neden olan akrozom ve kuyruk anomalileri : < % 25.
- Normal spermatozoidler : > % 75
- Boğuma sahip spermatozoidler: < %30

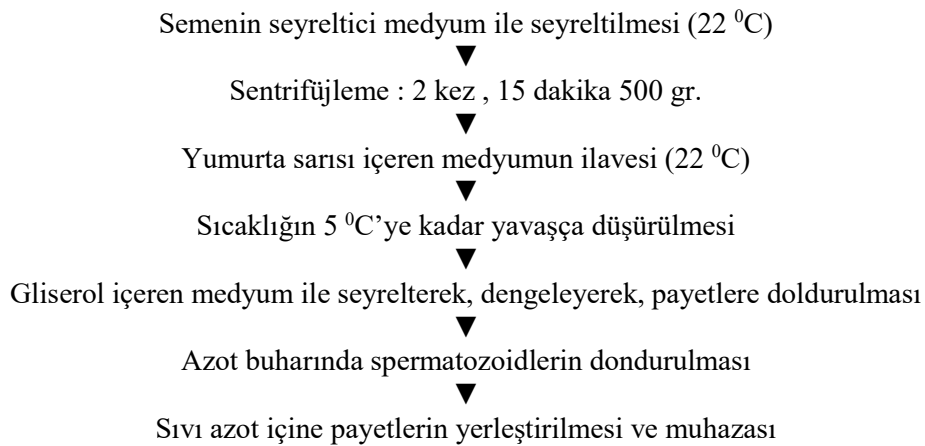
## **Semenin Dondurularak Muhafazası**

Keçilerde genetik ıslah geliştirilmesi ve suni tohumlama uygulanması problemlerinin başında 5 °C’ de muhafaza edilen veya taze semene nazaran dondurulmuş semenin kullanımının fertilitenin azalmasına neden olmasıdır. Taze semen kullanımı ile (16-22 °C’de 4-6 saat boyunca) fertilitenin %70-80 seviyelerine yükselebileceği belirtilmektedir (Karatzas ve ark., 1997). 36 saate kadar 5 °C’ de muhafaza edilen semen ile %75’e yakın fertilitite oranı yakalanabilmektedir (Roca ve ark., 1997). Bunlara karşın dondurulmuş semen ile gerçekleştirilen tohumlamalardaki fertilitite oranlarının %60-65 seviyelerine düştüğü görülmektedir (Salvador ve ark., 2005; Leboeuf ve ark., 1998).

Yukarıda anılan ejakulat alım yöntemleri aracılığıyla alınan dondurulacak olan semenin uygun koşullar altında muhafaza edilerek analizlerinin yapılması ve işlenmesi gerekmektedir. Spermatozoidler için en uygun koşulları oluşturmak için en önemli koşullardan birisi en kısa sürede, hızlı bir şekilde işleme sürecinin yapılarak dondurulması gerekmekte, bu süreç içerisinde gerekli sıcaklık koşullarını oluşturmak gerekmektedir.

Teke spermatozoidlerinin dondurulmasında dikkat edilmesi gereken nokta diğer türlerden farklı olarak seminal plazmanın kaldırılmasıdır. Genel olarak teke semenin dondurularak muhafazasında kullanılan sulandırıcılar yumurta sarısı ve kaymağı alınmış süttür. Fakat bu söz konusu seyreltici maddeler ile semen plazması arasında meydana gelen zararlı interaksyonlar sperm hücrelerine toksik etki yapmakta, dolayısıyla ölmelerine neden olmaktadır (Purdy, 2005). Bu olumsuz etkiyi azaltmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan ilki semen plazmasının yıkanarak uzaklaştırılmasıdır. Diğer bir yöntem söz konusu seyrelticilerin oranlarını azaltmaktır. Salamon ve Ritar (1982), yumurta sarısının %1,5 miktarında kullanımının semen plazmasının yıkanmasına gerek kalmadığını bildirmişlerdir. Diğer bir yöntem semen plazmasının lipazlarının inhibitörlerinin kullanılması; trigliserit içermeyen ama sütün kazeinleri gibi proteinlerini içeren seyrelticilerin kullanımınıdır (Purdy, 2005).

En yaygın kullanılan yöntem 1:5 veya 1:10 seyreltici aracılığıyla ve 10-15 dakika boyunca 500-1000 gr. Santrifüjleme ile oluşan çözeltinin uzaklaştırılması yöntemidir (Leboeuf, 2000). Sperm kriyokonservasyonunda yumurta sarısı veya yağsız süt farklı oranlarda kullanılmaktadır. Konyalı ve ark. (2013), yağsız süt, %20 yumurta sarısı veya %2 yumurta sarısının Tris çözeltisiyle birlikte kullanımının teke spermasının dondurulmasında başarıyla kullanıldığını bildirmişlerdir.



Şekil 10. Örnek dondurma protokolu



## **Kolesterol İle Doyurulmuş Siklodekstrin İlavesinin Teke Spermatozoidlerinin Dondurulması Üzerine Etkisi**

Dondurulmuş semenin kalitesi, taze veya soğutulmuş semene nazaran düşük olmaktadır. Dondurma süreci esnasında spermatozoidlerin %50'ye yakını zarar görmekte, yaşam gücünü kaybetmektedir (Curry, 2000). Çünkü spermatozoidlerin dondurma süreci boyunca biyokimyasal ve yapısal zararlar gören, bozukluklara uğrayan spermatozoidlerin, sonuç olarak dölleme kapasitesitelerini olumsuz etkilenmektedir. Holt, (2000) bu hasarların en önemli nedenlerinin ozmotik değişimler ve hücre içi buz kristallerinin oluşumu olduğunu bildirmiştir.

Türler arasında sıcaklığın azalmasına ve soğuk şokuna spermatozoidlerin direnci bakımından farklılık bulunmaktadır. Plazmatik membranın kompozisyonu söz konusu direnç üzerinde etkili olmakta; kolesterol : fosfolipid oranı yüksek olan insan ve tavşan spermalarının, kolesterol : fosfolipid oranı düşük olan domuz, teke, boğa gibi türlere nazaran daha dirençli olduğu bildirilmektedir (Watson, 1981; Parks ve Lynch, 1992; White, 1993).

Siklodekstrinler hücre membranlarının kolesterol içeriğini değiştirmede kullanılabilmede (Christian ve ark., 1997; Visconti ve ark., 1999) ve eğer siklodekstrinler kolesterol ile doyurulursa, onlar kolesterolü membranların içine sokmaktadırlar. Purdy ve Graham (2004), spermatozoidlere kolesterol ile doyurulmuş siklodekstrin uygulamasının uygulanmayanlara nazaran canlılık ve hareketlilik parametreleri bakımından önemli derecede daha iyi durumda olduğunu bildirmişlerdir. At spermalarında yapılan bir çalışmada semenin dondurulmasından önce siklodekstrin ilavesinin, hareketli sperma ve membran bütünlüğüne sahip sperma oranlarının iyileştiği gözlenmiştir (Combes ve ark., 2000; Moore ve ark., 2005; Torres ve ark., 2006). Teke spermasının dondurulmasında kullanılan en önemli 2 medyum yumurta sarısı ve yağsız süttür. Fakat yalnızca bu dondurma ortamlarının kullanılması istenen çözdürme sonrası kaliteyi sağlamamaktadır. Konyalı ve ark. (2013), kolesterol ile doyurulmuş siklodekstrin uygulamasının dondurma çözdürme sonra sperm kalitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Yine aynı yazarlar yumurta sarısından oluşan dondurma çözeltisinin yağsız süte kıyasla daha yüksek hareketli ve canlı sperm sağladığını rapor etmişlerdir. Çözdürme sonrası sperm kalitesi için dondurma medyumunun yalnızca kolesterol ile doyurulmuş siklodekstrinden oluşması başarı sağlanması için yeterli olmamakta, yumurta sarısının sağladığı ortamı sunmamaktadır (Konyalı ve ark., 2014).

### **Sonuç**

İslah çalışmalarının uygulama alanında önemli bir aracı olan suni tohumlama uygulamasının temel hammaddesi olan dondurulmuş spermatozoidlerin alım, analiz ve işleyerek dondurma süreçlerinin geliştirilmesi döl verimliliği oranı iyileştirmekle kalmayacak, ekonomi ve genetik ilerleme bakımından büyük katkılar sağlayacaktır. Boğa semen işleme ve dondurma tekniklerine nazaran, daha fazla araştırma ve kendine has protokole ihtiyaç duyan teke spermalarının dondurma işlemi için kolesterol doyurulmuş siklodekstrin yöntemi etkili bir yöntem olmaya adaydır. Standardize edilmiş analiz yöntemlerinin kolaylıkla uygulanabilirliği ve hata paylarının minimize edilmesi fertilitite için temel bir adımdır. Bunun yanında kriyokonservasyonun zararlı etkilerinin azaltılmasında pahalı olmayan, zaman ve iş gücü bakımından tasarruf sağlayan protokollerin uygulanması gerekmektedir. Dondurma çözdürme öncesi kolesterol ile doyurulmuş siklodekstrin uygulaması bunlardan biridir. Bu bağlamda teke spermatozoidlerinin işleme ve dondurma protokolu ile katkı maddeleri bakımından yapılacak araştırmalar döl verme oranını arttırmaya yardımcı olacaktır.

Makale, araştırma yayın etiğine uygun olarak hazırlanmıştır.

## Kaynaklar

- Bearden, H.J., Fuquay, J.W., Willard S.T. 2000. Applied Animal Reproduction. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
- Chandler, J.E., Painter, C.L., Adkison, R.W., Memon, M.A., Hoyt P.G., 1988. Semen Quality Characteristics of Dairy Goats. Journal of Dairy Science. Vol. 71, No. 6. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79728-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79728-3).
- Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. J. Lipid Res. 38 : 2264-2272.
- Combes, G.B., Varner, D.D., Schroeder, F., Burghardt, R.C., Blanchard, T.L., 2000. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 56, 127-132.
- Corteel, J.M., 1977. Production, storage and artificial insemination of goat semen. Management of Reproduction in Sheep and Goats Symposium, Madison, July 24–25, s. 41–57.
- Curry, M.R., 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. Rev. Reprod. 5:46–52.
- Delgadillo, J.A., 1990. Abolition des variations saisonnières de l'activité sexuelle chez le bouc par des traitements photopériodiques. Thesis, Montpellier, France, 119 s.
- Derashri, H.J., Pathak, A.K., Bansal, K.K., Sharma, A.K., Verma, S.K., 1992. Reproduction in buck: 2. Daily sperm output, extra-gonadal sperm reserve, daily sperm production rate and seminiferous tubule length. Pre-Conference Proceeding, Abstract of Contributory papers, 5th Int. Conf. on Goats, New Delhi vol. 1 s. 264.
- Gillan, L., Kroetsch, T., Chis Maxwell, W.M., Evans, G., 2008. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. Animal Reproduction Science 103, 201–214.
- Graham, J.K., 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. Anim. Reprod. Sci. 68, 239–247.
- Graham, J.K., Mocé, E., 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. Theriogenology. 2005 Aug;64(3):492-504. doi: 10.1016/j.theriogenology.05.006. PMID: 15946734.
- Hafez, E.S.E., 1993. Reproduction in farm animals. 6. Edition. Lea&Febiger, Philadelphia.
- Herman, H.A., Mitchell, J.R., Doak, G.A., 1994. The Artificial Insemination and Embryo Transfer of Dairy and Beef Cattle. 7. Edition. Interstate Publishers, Inc.
- Holt, W., Watson, P., Curry, M., Holt, C., 1994. Reproducibility of computer-aided semen analysis: Comparison of five different systems used in a practical workshop. Fertil Steril 62, 1277-1282.
- Holt, W.V., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. Theriogenology 53:47–58.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. Theriogenology 53, 859–875.

- Karatzas, G., Karagiannidis, A., Varsakeli., S., Brikas, P., 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Hheriogenology* 53, 47-58.
- Konyali, C., Tomás, C., Blanch, E., Gómez, E.A., Graham, J.K., Mocé, E., 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology*. 2013 Oct;67(2):124-31. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.06.001. Epub 2013 Jun 11. PMID: 23770515.001.
- Konyali, C., Tomas, C., Blanch, E., Gomez, E.A., Moce, E. (2014). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on the motility of goat sperm frozen in diluents deprived of egg yolk. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 115-115.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62, 113-141.
- Mocé, E, Graham, J.K., 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci*. 2008 Apr;105(1-2):104-18. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.016. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18178345.
- Mocé, E., 2008. *Notas de Biotecnología de la Reproducción*. Valencia.
- Moore, A., I., Squires, E., L., Graham, J., K., 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51, 241–249.
- Parks, J. E., Lynch, D., V., 1992. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29:255–266.
- Purdy, P. H., Graham, J., K., 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48:36–45.
- Purdy, P., 2005. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*.
- Roca, J., Carrizosa, J., A., Campos, I., Lafuente, A., Vazquez, J., M., Martinez, E., 1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa dilute in Tris-egg yolk extender and stored at 5 °C. *Small Ruminant Research* 25, 147-153.
- Rodriguez-Martinez, H., 2006. Can we increase the estimate value of semen assessment? *Reprod. Domest. Anim.* 41 (Suppl. 2), 2–10.
- Rouger, Y., 1974. *Etude des interactions de l'environnement et des hormones sexuelles dans la régulation du comportement sexuel des Bovidae*. Thèse de Doctorat, Université de Rennes, 197 s.
- Salamon, S., Ritar, A.J., 1982. Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 35, 295–303.
- Salvador, I., Viudes-de-Castro M., P., Bernacer, J., Gomez, E., A., Silvestre, M., A., 2005. Factors affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano-Granadina goats. A field assay. *Reproduction in domestic animals* 40, 526-529.
- Torres, P., Serres, C., Gómez-Cuétara, C., Santiago, I., Mateos, E., Álvarez, A., L., 2006. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. *Animal Reproduction Science* 94, 148–151

- Tuli, R.K., Holtz, W., 1992. The effect of season on seminal characters in Boer goat bucks in the Northern temperate zone. Recent Advances in Goat Production. Proc. papers presented at 5th Int. Conf. on Goats. New Delhi, Abstract No. 1195.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:149-179,2002. Elsevier Science Inc.
- Visconti, P. E., H. Galantino-Homer, X. Ning, G. D. Moore, J. P. Valenzuela, C. J. Jorgez, J. G. Alvarez, G. S. Kopf. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J. Biol. Chem.* 274:3235–3242.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., 1994. The ‘female effect’ in Australian cashmere goats: effect of season and quality of diet on the LH and testosterone response of bucks to oestrous does. *J. Reprod. Fertil.* 100, 521–531.
- Watson, P. F. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. S. 189–218 in *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. G. J. Morris and A. Clarke, ed. Academic Press, London, UK.
- White, I., G., 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:639–658.