

## BOĞA SPERMASININ SULANDIRILMASINDA PH ve OZMOTİK BASINCIN ÖNEMİ (Derleme)

Abdullah Kaya<sup>1</sup>

The important of pH and ozmotic pressure  
in extended bovine semen: A review

### SUMMARY

In this review, the effects of pH and osmotic pressure of the semen extenders on sperm quality were stressed.

KEY WORDS: Bull, Semen, pH, Osmotic pressure,

### ÖZET

Bu derlemede, sperma sulandırıcılarının pH ve ozmotik basıncının saklama koşullarında sperma kalitesi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Boğa, Sperma, pH Ozmotik basınç,

### GİRİŞ

Boğa spermasının yoğunluğu oldukça yüksek olup, bir ejakülasyonda alınan sperma ile çok sayıda hayvan tohumlanabilmektedir (Salisbury ve ark. 1978). Bunun için, spermanın özelliklerini kaybetmeden uygun bir sulandırıcı ile yeterli spermatozoon yoğunluğu sağlanacak şekilde hacim ve yaşama süresi artırılarak muhafaza edilmesi gerekmektedir (Garner 1991, Salisbury ve ark. 1978).

Spermanın muhafazasının amacı, spermatozoonların ejakülasyondan sonraki morfolojik ve fonksiyonel bütünlüğünü tohumlamada kullanılmaya kadar koruyabilmelerinin sağlanmasıdır (Coulter 1992). Spermatozoonların fonksiyonel bütünlüğü, ovumu döllemesi ve embriogenezin devamının sağlanması olarak bildirilmektedir (Hafez 1987). Fertilizasyondan sonra normal embriyo gelişimi için spermatozoonların kromatinindeki genetik materyalin bütünlüğünün de korunması gerekmektedir. Ancak genetik yapının kontrolü konusunda geliştirilmiş sperma kalite testi bulunmamaktadır (Salisbury ve ark. 1978).

Spermanın özelliklerini kaybetmeden gerek hacmini gerekse yaşama süresini artırarak saklama olanakları üzerine yapılan bilimsel çalışmalarda bazı hayvan türlerinde spermatozoonların hem kısa hem de uzun süreler için dölleme gücünü kaybetmeden uygun bir medyum ile sulandırılarak muhafaza edilebileceği ortaya konmuştur (Yurdaydın 1990).

### Sperma Sulandırıcılarında Bulunması Gereken Özellikler

Sulandırıcının ozmotik basıncı izotonik olmalı ve aynı basıncı tüm saklama süresince muhafaza etmelidir. Spermatozoonların beslenmesini sağlayacak besin maddelerini içermeli ve soğuk

şokuna karşı spermatozoonları korumalıdır. Spermatozoonların metabolizmasına bağlı olarak artan laktik asitten kaynaklanan pH değişimlerinin önlenmesi için tampon maddeler içermelidir. Spermatozoonlara ve dişi genital organlara zarar verecek, fertilizasyonun şekillenmesine, embriyonun implantasyonuna ve gelişmesine engel olabilecek enfeksiyöz etkenlerini taşımamalıdır. Sulandırıcılarda bulunan kimyasal ve biyolojik maddeler her zaman bulunabilen ucuz maddeler olmalıdır. Hücre enzimlerinde bulunan sülfidriki koruyabilmesi için kaybolan ve azalan maddeleri içermeli ve spermanın hacmini istenilen ölçüde artırarak, fazla sayıda hayvanın tohumlanmasına imkan sağlamalıdır. Spermatozoonların canlılığını ve aktivitelerini uzun süre korumalıdır. Dişi genital organlarının dışında spermatozoonların hareketlerini mümkün olduğunca asgariye indirmelidir (Coulter 1992, Hafez 1987, Özkoca 1984, Salisbury ve ark. 1978, Yurdaydın 1990).

### Sperma Sulandırıcılarına Katılan Maddelerin pH ve Ozmotik Basınca Etkileri

Tamponlar; Kimyasal olarak zayıf asit ve baz tuzlarının karışımından oluşan tamponlar, H<sup>+</sup> ve OH<sup>-</sup> iyonlarını bağlayarak pH değişikliklerini mümkün olduğunca sınırlandırmaktadırlar. Tamponlanmamış spermada fruktolizis sonucu açığa çıkan laktik asit, pH'ı düşürerek motiliteyi azaltmaktadır (Mytzka 1988). Bu yüzden sperma sulandırıcıları, pH'ı dengede tutabilecek tampon maddeleri içermelidir. Spermanın sulandırılması ve dondurulmasında kullanılan en iyi tamponların sitrat, Na - sitrat, fosfat, karbonat ve tris olduğu bildirilmektedir (Mengi 1984, Mytzka 1988).

Karbohidratlar; spermatozoonların metabolizması ve motilitesi için gerekli enerjiyi sağlamaları yanında ozmotik basıncın regülasyonunu, ısının düşürülmesi ve dondurulması

esnasında spermatozoonların soğuk şokundan zarar görmesini engellemektedir (Çoyan 1993, Hafez 1987).

Süt; içerdiği besin maddeleri, süt şekeri, protein ve çeşitli vitaminler açısından oldukça zengin olması, pH ve ozmotik basıncının uygun olması nedeniyle sperma sulandırıcılarına katılması önerilmektedir (Bush 1991, Norman ve ark. 1958).

Yumurta sarısı; içerdiği lesitin, lipid - protein kompleksi ve glikoz nedeniyle spermatozoonların soğuk şokundan korunmasını sağlamaktadır. Spermatozoonların çevresinde oluşturduğu koloidal tabaka, hareketlerini kısıtlayarak metabolizmayı yavaşlatmakta ve metabolik artıkların elimine edilmesini sağlamaktadır (Coulter 1992, Hafez 1987).

Kryoprotektantlar; sperma sulandırıcılarına yumurta sarısı, etilen glikol, propilen glikol, gliserol ve DMSO (Dimetyl Sulfoksida) gibi kryoprotektanlar katılmaktadır. Bunlardan yaygın bir şekilde kullanılan gliserol, bulunduğu ortamın donma noktasını düşürür, spermatozoonların su kaybetmesini sağlar, su moleküllerinin yapısını değiştirerek büyük buz kristalleri oluşumunu engelleyerek ozmoregülasyonun düzenlenmesini sağlamaktadır (Coulter 1992, Hafez 1987, Salisbury ve ark. 1978).

Antibiyotikler; spermanın alınması esnasında yada erkek genital sisteminden köken alan mikroorganizmaların spermadaki gelişimini inhibe etmek için sulandırıcıya genellikle Penisilin, Streptomisin ve Polymyxin B ya da geniş spektrumlu diğer antibiyotiklerin kombinasyonları ilave edilmektedir. Ancak antibiyotik katılması da bakterilerin tamamen elimine edilmesi için yeterli olmamaktadır. Yüksek dozları ise spermatozoonlar üzerine toksik etki etmektedir (Çoyan 1993, Hafez 1987). Bunun için spermatozoonlara zarar vermeyen ve mikroorganizmaların duyarlı oldukları pH değişimlerinin, mikroorganizmaların eliminasyonunda bir yöntem olabileceği ileri sürülmektedir (Bielanski ve ark. 1991).

Spermanın sulandırılması ve saklanmasında rol oynayan en önemli faktörlerin soğutma ısı, sulandırıcının ozmotik basıncı ve pH' ısı olarak bildirilmektedir (Würgau ve Leidle 1989).

### Ozmotik Basıncın Spermatozoonlar Üzerine Etkisi

Birim hacimdeki sıvı içerisinde çözünen maddelerin konsantrasyonu sıvının ozmotik basıncını oluşturmaktadır (Mytzka 1988). Buna göre bir sıvının ozmotik basıncı içerdiği partiküller, iyonlar, elektrolit olmayan küçük moleküller ve büyük kolloidlerin konsantrasyonlarına bağlıdır. Çözünen maddeler çözücü içinde donma noktasının düşmesi, kaynama noktasının yükselmesi ve buharlaşma ısısının düşmesi gibi karakteristik değişikliklere neden olmaktadır (Mengi 1984, Salisbury ve ark. 1978).

Ozmotik basınç, ozmometre ile ölçülmesi yanında hazırlanması kolay olan solusyonlar veya

karişimlerin donma noktasında görülen düşmenin tayini ile de hesaplanmaktadır. Donma noktasının düşmesi, ozmotik basınçta olduğu gibi iç faz parçacıklarının sayısı ile doğru orantılıdır. Eriyebilen maddelerin bir molar konsantrasyonu suyun donma noktasını 1.86 °C düşürür. Genellikle ozmotik basıncın hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmaktadır.

$$m.Osmol / kg.H_2O = \frac{\Delta \cdot 1000}{1.86}$$

Δ: Donma noktasındaki düşüş

Boğa spermasının donma noktası (Δ) -0.56 °C'dir. Formüle göre hesaplandığında boğa spermasının ozmotik basıncının yaklaşık olarak 300 miliosmol olduğu bulunmaktadır.

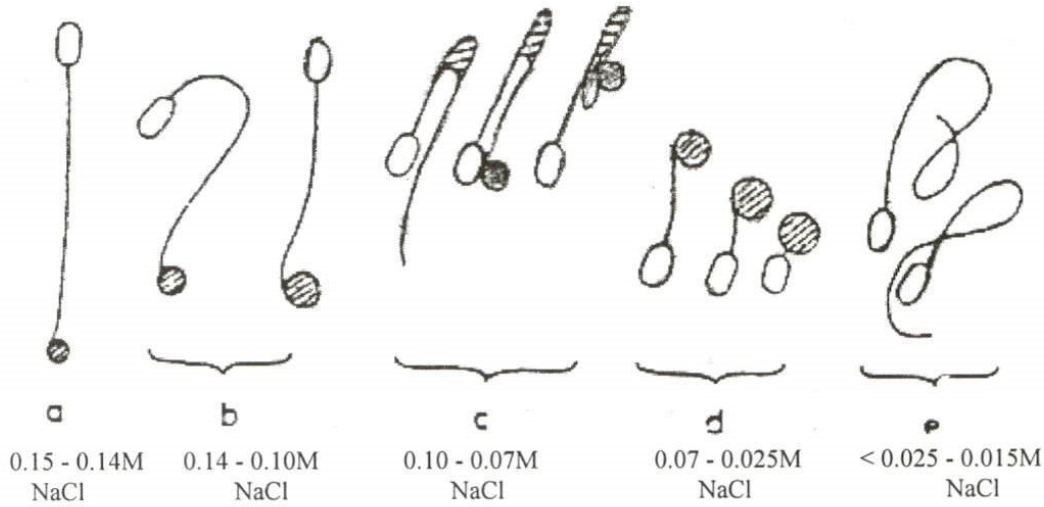
Bu basınç izotonik olarak kabul edilmekte ve spermatozoonların normal fonksiyonunu sürdürmesi ve besin metabolizması için gerekli olduğu bildirilmektedir (Mytzka 1988, Salisbury ve ark. 1978). Spermatozoa sayısı ile donma noktası düşmesi arasında pozitif bir korelasyonun olduğu, spermatozoa sayısı arttıkça donma noktasının düşme büyüklüğünün arttığı bildirilmektedir (Pursley ve Herman 1950, Smith ve ark. 1953).

Hücre içi ve hücre dışı sıvıların ozmotik basınçları 5.98 - 7.70 Atm. arasındadır. Bu basınç ortalama 0.16 M yoğunlukta (% 0.9) NaCl' e, 0.32 M yoğunlukta iyonlaşmayan bir maddenin (üre, glikoz vb.) çözeltisinin ozmotik basıncına eşittir. Bu ozmotik basınç izotonik olarak kabul edilmekte ve beyin, omurilik sıvısı, kan ve sperma gibi vücut sıvılarının ozmotik basınçlarının bu değerler arasında olduğu bildirilmektedir (Mengi 1984).

Sperma sulandırıcılarının ozmotik basıncının izotonik olması halinde spermatozoonlar etkilenmez iken hipertonic yada hipotonik olması halinde olumsuz yönde etkilenmektedirler (Glover ve Watson 1985, Pursley ve Herman 1950). Sulandırıcının hipotonik olması, spermatozoonların içerisine sıvı geçişine neden olur ve bunun sonucu olarak spermatozoonların baş kısmında şişme, membranında yırtılma, motilitede azalma ve kuyruk kısmında kıvrımlar şekillenmektedir (Würgau ve Leidle 1989).

Drevius ve Eriksson (1966), boğa spermatozoonlarının hipotonik medyumda ozmotik şişmeden dolayı kuyruklarının kıvrıldığını ve genişleyerek parlak bir vezikül şeklinde görüldüğünü bildirmektedirler. Hipotonite arttıkça vezikül büyüklüğünün de arttığı kaydedilmektedir (Resim 1). Hafif hipotonisitede, spermatozoonların kuyruk ucunda vezikül şeklinde küçük kıvrımlar şekillenmekte ve bazen çözülebilmektedir. Orta derecedeki hipotonitede, U şeklinde kuyruk kıvrımlı spermatozoonların oranı artarken yüksek derecedeki hipotonitede ise kuyruk kıvrımları tamamen zarf şeklini almaktadır.

Resim1. Değişik hipotoniteye sahip medyumlardaki spermatozoonların şematize görünüşleri



Sulandırıcının hipertonik olması halinde ise hücre içindeki sıvının dışarı çıkmasına, bunun sonucu olarak da spermatozoonların büzülmesine neden olmaktadır. Bu durum spermanın dondurulması esnasında da hücre içindeki suyun dışarı çıkmasını sağlayarak hücre içi buz kristallerinin oluşmasını engellemektedir (Würgau ve Leidl 1989).

Spermatozoonlar üzerine hipertonik sulandırıcıların hipotonik sulandırıcılara göre daha az olumsuz etkisinin olduğu bildirilmektedir (Glover ve Watson 1985, Watson ve Martin 1976). Ancak bu konuda ileri sürülen diğer bir görüşe göre de, boğa spermatozoonları hipertonik solüsyonlara hipotonik solüsyonlardan daha duyarlı olduğu şeklindedir. Çünkü; spermanın muhafazası esnasında yaşlanması ve metabolizmasına bağlı olarak şekillenen laktik asit artışları muhtemelen hipotonik bir sulandırıcının ozmotik basıncını artırarak izotonik bir basınca doğru yükseltmekte, oysa aynı koşullarda hipertonik sulandırıcılarda zaten uygun olmayan koşulların daha da şiddetlenmesine yol açtığı ileri sürülmektedir (Pursley ve Herman 1950, Smith ve ark. 1953).

Sperma sulandırıcıların ozmotik basıncı 285 - 376 mOsm/l arasında değişmektedir. Ozmotik basıncı 102 - 565 mOsm/l arasında değişen sulandırıcılarda spermatozoonların yaşama süreleri ve motilite açısından yapılan çalışmalarda en iyi sonuçların 236 - 327 mOsm/l arasında değişen sulandırıcılarda alındığı bildirilmektedir. Spermatozoonlar için üst sınırın 370 mOsm/l olduğu tespit edilmiştir (Glover ve Watson 1985, Mytzka 1988, Pursley ve Herman 1950). Spermatozoonların morfolojisi üzerine yalnızca güçlü hipertonik ve güçlü hipotonik solüsyonların karakteristik olarak kıvrılmış kuyruklu şeklindeki anormalitelere neden olduğu bildirilmektedir (Pursley ve Herman 1950).

Natif boğa sperması, sığır kanı ile aynı ozmotik basınca sahiptir. Bu basıncı sağlamak için sulandırıcılara % 2.9'lük sodyum sitrat'ın ilavesi tavsiye edilmektedir (Pursley ve Herman 1950). Sodyum sitrat'ın % 5'lik konsantrasyonları

spermatozoonların motilitesi üzerine ani bir ters etkiye sahip iken % 1'lik konsantrasyonunu tolere edebilmektedir. Fakat bu konsantrasyon da motiliteyi sürdürmede yetersiz kalmakta ve spermatozoonların geriye yada dairevi hareket etmelerine ve kıvrılmış kuyruklu spermatozoon oranının yükselmesine neden olmaktadır (Smith ve ark. 1953).

Spermanın sulandırma, soğutma, dondurma ve çözündürme işlemleri sırasındaki ozmotik basınç değişikliklerine karşı spermatozoonların oldukça duyarlı olduğunu bildiren Correa ve ark. (1996), bu aşamalarda şekillenebilecek ozmotik şoka bağlı olarak ölü ve kıvrık kuyruklu spermatozoon oranında artma ile membran bütünlüğünde azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir.

Spermanın saklanması amacıyla kullanılan sulandırıcıların ozmotik basıncı, spermatozoonlarda morfolojik ve fonksiyonel bozuklukların oluşmasının engellenebilmesi için izotonik olması gerektiği bildirilmektedir (Glover ve Watson 1985, Pursley ve Herman 1950, Salisbury ve ark. 1978).

#### pH' nın Spermatozoonlar Üzerine Etkisi

Tüm hücrelerde olduğu gibi spermatozoonlar da pH değişimlerine karşı oldukça duyarlıdır ve pH' nın çok iyi kontrol edildiği ortamlarda fonksiyonlarını sürdürmektedirler (Mengi 1984, Mytzka 1988).

pH; solüsyonda bulunan H<sup>+</sup> iyonu molar konsantrasyonunun eksi logaritması olarak tanımlanmaktadır (pH= -log [H<sup>+</sup>]). Bir solüsyonun pH'sı 7'den küçük ise asit, 7'den büyük ise baz, 7 ise nötr olarak bilinmektedir. Spermatozoonlar tür farkı olmaksızın pH değişimlerine karşı oldukça duyarlıdır (Mytzka 1988). Aşırı pH değişikliklerinin spermatozoonlarda motilite kaybına ve akrozomda bozukluklara neden olduğu bildirilmektedir (Brückner ve Kaempfer 1984).

Spermanın sulandırılması, saklanması ve fertilitesi yönünden sulandırıcı pH'sının önemi büyüktür (Özkoca 1984). Sun'i tohumlama veya

tabii aşımında spermatozoonlar dışı genital kanalın değişik pH daki salgıları ile temas halindedir. Bu salgıların pH'ının kuvvetli asidik veya kuvvetli alkali olması motilitenin azalmasına, hafif alkalik olması ise motilitenin artmasına neden olmaktadır (Brückner ve Menger 1985).

Yeni ejaküle edilen boğa spermasının pH'ı içerdiği çeşitli salgıların oranlarına bağlıdır (Salisbury ve ark. 1978). Yapılan çalışmalarda boğa spermanın pH'sı 5.8 - 7.4 arasında değişmekle birlikte ortalama olarak 6.9, yani hafif asidik olduğu tespit edilmiştir (Özkoca 1984, Salisbury ve ark. 1978). Spermatozoon yoğunluğu düşük ejakülatlarda uretra ve erkek eklenti bezlerinden salgılanan sıvı miktarına bağlı olarak pH'ı alkalidir. Sun'i vajenle alınan sperma, masaj yoluyla alınandan daha düşük bir pH'ya sahiptir. Ejakülasyondan sonra spermatozoonların fertilitelerinin korunması için muhafaza esnasında metabolik aktivitelerinin inhibe edilmesi ve tohumlama esnasında ise tamamen geriye dönüşümlü olmasına bağlıdır (Salisbury ve ark. 1978, Salisbury ve Kinney 1957).

Genellikle dar toplama kaplarında mevcut olan anaerobik ortamda, spermatozoonların spermadaki fruktozu laktik aside dönüştürmesi ile sperma pH'sının, ejakülatın alınması ve değerlendirilmesi arasındaki zamanın uzamasına bağlı olarak düştüğü bildirilmektedir. pH'nın azalması metabolik aktivitenin inhibisyonuna neden olur ve motilitenin azalmasına yol açar. Bu pH değişimlerinden korunmak için tüm memeli spermatozoonları 5.0 - 8.5 arasındaki oldukça geniş pH değerlerini tolere edebilmektedirler (Mytzka 1988). Geniş toleransa rağmen her memeli hayvan türünün sperması fonksiyonlarını sürdürebilmesi için dar sınırlar içinde ideal pH değerlerine sahiptirler (Bush 1991). Boğa sperması, taze saklanması ve uzun süreli dondurulmasında pH'nın 6.5 - 6.9 arasında değiştiği hafif asidik sulandırıcılarda motiliteyi daha iyi sürdürebilmektedir. Buna karşılık metabolik aktivite ve dölleme yeteneğinin, nötr yada hafif alkali pH' da arttığı bildirilmektedir (Foote 1970a, Foote 1970b). Genel olarak sulandırıcının asidik olması halinde spermatozoonlarda motilite, solunum ve glikoliziste düşme, alkali olması durumunda ise bu fonksiyonlarında artış gözlenmektedir (Bush 1991). pH ile motilite arasındaki ilişkiye saklama ısısının da önemli etkisi bulunmaktadır (Mytzka 1988).

Bakteri kontaminasyonuna uğrayan veya ölü spermatozoon oranı yüksek olan ejakülatların pH'ı, oluşan amonyak nedeniyle yükselmektedir. Sık alınan, spermatozoon içermeyen, vazektomize edilmiş yada epididimitisli boğalardan alınan ejakülatların pH'ı alkaliktir (Salisbury ve ark. 1978).

Suni Tohumlamanın en önemli sakıncalarından biri de patojen ajanların sperma ile nakledilmesidir. Patojenlerin baskılanması veya uzaklaştırılması, bakteriyel mikroorganizmalara karşı etkin olan antibiyotikler ve virüslere karşı etkin olan Tripsin yada immunolojik özelliğe sahip sulandırıcılarla ejakülatlarda bulunan bakterilerin elimine edilmesinin sınırlı olduğu bildirilmektedir. Bunun için bazı virüsler pH'nın 5 - 6 arasında olduğu ortamlarda kısa süre içerisinde inaktive edilebildiğinden spermanın kısa süreli asitlendirilmesinin bakterileri

eliminasyonunda alternatif bir metot olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Bielanski ve ark. 1991).

Bielanski ve ark. (1991), yaptıkları bir çalışmada boğa spermasını 37°C' de asitlendirerek pH'sını düşürdükten sonra (pH=5), 2 ve 5 dakikalık sürelerle muhafaza edip, tekrar alkalizasyonla başlangıçtaki pH' düzeyini sağlamışlar, daha sonra dondurup-çözdürdükleri spermatozoonların motilite, akrozom morfolojisi ve süperovulasyon uygulanan ineklerin tohumlanması ile fertilitenin açısından incelemişlerdir. Araştırma sonucunda pH'nın geçici olarak 5'e düşürülmesinin motilite, akrozom morfolojisi ve fertilitenin yönünden olumsuz bir etkisinin olmadığını, virüslerin ise elimine edildiğini, kısa süreli asitlendirmenin patojenlere karşı spermanın korunması için kullanılabilecek iyi bir metot olabileceğini ileri sürmektedirler.

Sperma ve spermatozoonlarda bulunan enzimler, faaliyetlerini sürdürebilmeleri için belirli bir pH' ya ihtiyaç duymaktadırlar. Metabolik faaliyetlerde görev alan bir çok enzim, asitle inhibe edilerek solunum, glikolizis ve motilitede düşüşe neden olmaktadır. Spermatozoonların aktivitesi ve enzim inhibisyonu pH'nın 5.5' in altına düşmediği sürece alkalizasyonla yeniden düzeltilebilmektedir. Ancak pH'nın 5.5 altına düşmesi halinde spermatozoonlarda geri dönüşü mümkün olmayan yıkımların olduğu bildirilmektedir (Mytzka 1988, Norman ve ark. 1958, Salisbury ve ark. 1978). Fruktoz ile motilite spermatozoonlar arasında doğru bir orantının olduğu, fruktoz yüksek olduğu ejakülatlarda motilitenin de yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tamponlanmamış sulandırıcılarda fruktoz sonucu açığa çıkan laktik asit'in pH azalmasına yol açarak motiliteyi düşürdüğü bildirilmektedir (Çoyan 1993).

Norman ve ark. (1958), yaptıkları bir çalışmada pH=5.5' in altında irreversible enzim denatürasyonlarının oluştuğunu, bunun sonucu olarak da aşırı hidrojen iyonu konsantrasyonunun spermatozoonlara letal etkisinin bulunduğunu bildirmektedirler.

pH'ı 6.25, 6.50 ve 6.75 arasında değişen sulandırıcılarda boğa spermatozoonlarının yaşama kabiliyeti, motilitesi ve fertilitelerini karşılaştıran Foote (1970a), 6.50 ve 6.75 arasında değişen pH' ya sahip sulandırıcıların daha iyi sonuç verdiği tespit etmiştir.

Foote (1964), boğa spermasının fertilitelerini değişik pH oranlarında karşılaştırmak için sulandırıcıya sitrik asit ilave ederek pH'sını 6.80, 6.65 ve 6.50'ye tamponladıktan sonra tohumladığı ineklerin 60 - 90 gün arasında dönmeyenler oranına göre fertilitelerinde bir farklılığın olmadığını bildirmektedir. Karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve sitrik asit ilave ederek pH'ını 6.4' e ayarladığı sulandırıcıların her ikisinde de muhafazadan sonra spermatozoonlar iyi bir yaşama kabiliyetine sahip olurken, sitrik asit ilave edilen sulandırıcılarda motilitenin daha yüksek olduğunu bildirmektedir. Bu farklılığın muhtemel nedeni olarak, zamanla sulandırıcıdaki CO<sub>2</sub>' in azalması sonucu metabolizmanın artması ve buna bağlı olarak pH' daki düşüş gösterilmektedir.

Cragle ve Salisbury (1958) yaptıkları bir çalışmada, düşük pH ve yüksek K<sup>+</sup> düzeylerinin, O<sub>2</sub> tüketimi, fruktoz kullanımı ve laktik asit birikimi gibi metabolik faaliyetleri baskıladığını, ozmotik basıncın ise metabolizma faaliyetleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığını bildirmektedirler. K<sup>+</sup> 'un inhibitör etkisinin Ca<sup>++</sup> ile tekrar düzeltildiğini ve böylece metabolizma üzerine yalnızca pH'nın etkili olduğunu bildirmektedirler.

Willet ve Ohms (1958), YS (Yumurta sarısı-Sitrat) ve YGL (Yumurta sarısı-Glikoz-Laktat) ile sulandırılan spermadaki spermatozoonların inaktivasyonunu ve kısa süreli saklanmasıyla sonradan alkalizasyonla reaktivasyon oranlarını karşılaştırmışlardır. Düşük (pH=6.4) ve normal pH'ya (pH= 6.79) sahip YGL sulandırıcılarında spermatozoonlarda NaHCO<sub>3</sub> ile belirgin bir reaktivasyon sağlandığını, YS sulandırıcılarında ise düşük bir reaktivasyonun sağlandığını bildirmektedirler. Motilite farklılıklarının önemli olmamasına rağmen NaOH' in NaHCO<sub>3</sub> ten daha iyi bir reaktivasyon oranı sağladığını da bildirmektedirler. Laktat ile yapılan bu çalışmada, spermatozoonların yaşama kabiliyetinin bir kriteri olarak yalnız başına motilitenin güvenilir olmadığına işaret edilmektedir.

Çoğu zaman bazı spermatozoonların immotil yada düşük motiliteye sahip oldukları kanaatine varılmasına rağmen, gerçekte bu spermatozoonların alkalizasyonla reaktif edilmesi halinde yeniden istenilen motilite oranlarının elde edilebileceği tespit edilmiştir (Willet ve Ohms 1958).

PH ve ozmotik basınç arasındaki ilişkiyi araştıran Steinbach ve Foote (1969), zamanla bu ilişkinin arttığını, düşük pH' da spermatozoonlar hipotonik solüsyonlara, yüksek pH' da ise hipertonik solüsyonlara daha duyarlı olduğunu bildirmektedirler.

PH ve ozmotik basınç arasındaki diğer bir ilişki ise yüksek pH, düşük Tris konsantrasyonunda ve düşük pH' nın ise yüksek Tris konsantrasyonlarında daha toksik olduğu şeklindedir (Smith ve ark. 1953).

Spermatozoonlar ozmometre gibi davranıp, içinde buldukları medyumun ozmotik basıncına bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Medyumun ozmotik basıncının izotoniklikten sapması halinde spermatozoonların kuyruklarında kıvrılma, dairesel hareketler ve ölü spermatozoonların oranında artış gözlenmektedir (Salisbury ve ark. 1978). Spermatozoonlar ozmotik basıncın az miktarlardaki değişikliklerini, fertilitelerinde bir azalma olmaksızın tolere etme yeteneğine sahiptirler. Bu toleransın derecesi ortamın pH' sına, diğer iyonların varlığına ve bu iyonların birbiri ile etkileşmesine bağlıdır. pH'sı 5.7 - 6.0 arasında değişen tris, fruktoz ve Na- sitrat sulandırıcılarında spermatozoonların motilitelerinde bir değişim gözlenmezken, akrozomları şişen spermatozoonların oranında önemli artışlar tespit edilmiştir (Mytzka 1988).

Sonuç olarak, sperma sulandırıcılarının ozmotik basıncı izotonik, pH' sı nötr olmalı ve tüm saklama süresince aynı ozmotik basıncı ve pH' yı korumalıdır. Yeni sulandırıcılar geliştirilirken kullanılan kimyasal maddelerin ozmotik basınca yaptıkları katkıları gözönünde bulundurulmalı ve

sulandırıcı pH' sı nötr olacak şekilde tamponlanmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Aehnelt E (1953) Prüfungsergebnisse neuer Verdünnungsflüssigkeiten für das Bullensperma. Dtsch. tierärztl. Wschr. 60, Beilage Fortpfl. u. Besam. d. Haust. 7, 52-55.
- Bielanski A, Eastman P, Hare WCD (1991) Transitory acidification of semen as a potential method for the inactivation of some pathogenic microorganism. Effect on fertilization and development of ova in superovulated heifers. Theriogenology, 36 (1), 33 - 40.
- Brückner G, Kaempfer I (1984) Untersuchungen zum Einfluss des pH- Wertes vom zerviko-Vaginal-Sekret zum Inseminationzeitpunkt auf die Verteilung und migration von 131I-markiertem Sperma im Genitaltrakt des Schafes. Mh. Vet. Med., 39, 224-228.
- Brückner G, Menger H (1985) Die Bedeutung des pH- Werts für die Beurteilung der Spermaqualität und des Brunstverlaufs sowie für die Erreichung guter Befruchtungsergebnisse. 2.Mitteilung: Der pH-Status des ovinen Zerviko-Vaginal-Sekrets Zum Inseminationszeitpunkt, seine Beziehung zum Befruchtungsergebnis und die Wirkung einer exogenen Pufferapplikation. Arch. Exp. Vet. Med., 39 ( 3 ), 336-343.
- Bush W (1991) Künstliche Besamung bei Nutztieren. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Correa JR, Rodriguez MC, Patterson DJ, Zawos PM (1996) Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membran integrity. Theriogenology, 46, 413 - 420.
- Coulter GH (1992) Bovine spermatozoa in vitro: A Review of Storage, Fertility estimation and manipulation. Theriogenology, 38, 197 - 207.
- Cragle RG, Salisbury GW (1959) Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. IV. PH, Osmotic Pressure and the cations, sodium, potassium, and calcium. J. Dairy Sci., 42, 1304 - 1313.
- Çoyan K (1993) Spermatozoonların Metabolizması, Ders Notları, S.Ü. Veteriner Fakültesi.
- Drevius LO, Eriksson H (1966) Osmotic Swelling of mammalian Spermatozoa. Exp. Cell Res., 42, 136 - 156.
- Foote RH (1964) Influence of pH on survival and fertility of bull sperm. J. Dairy Sci., 47 ( 7 ), 807 - 811.
- Foote RH (1970)a. Fertility of Bull Semen at High Extension Rates in Tris-Buffered Extenders. J. Dairy Sci., 53, 1475- 1478.
- Foote RH (1970)b. Influence of Extender, Extension Rate, and Glycerolating Technique on fertility of Frozen Bull Semen. J. Dairy Sci., 53, 1478 - 1482.
- Garner DL (1991) Artificial Insemination, in "Reproduction in Domestic Animals " , 4<sup>th</sup>. Ed. P.T. Cupps, 271- 277, Academic Press, London.
- Glover TE, Watson PF (1985) The effect of buffer osmolality on the survival of cat (*Felis catus*)

- spermatozoa at 5° C. *Theriogenology*, 24 (4), 449 - 455.
- Hafez ESE (1987) Preservation and Cryopreservation of gametes and embryos, in "Reproduction in Farm Animals" , Ed. E.S.E. Hafez, 571 - 590, Lea Febriger, Philadelphia.
- Mengi A (1984) *Biyokimya, Ders Notları*, İ. Ü. Veteriner Fakültesi.
- Mytzka C (1988) Vergleichende Untersuchungen von Verdünnern zur Spermakonservierung bei Bulle, Schafbock und Ziegenbock unter besonderer Berücksichtigung von pH- Wert und Osmolaritaet. *Vet. Med. Diss, München*.
- Norman C, Johnson CE, Porterfield ID, RS, Dunder JR (1958) Effect of pH on the life-span and metabolism of bovine sperm kept at room temperatures. *J. Dairy Sci.*, 41, 1803 - 1812.
- Özkoca A (1984) *Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama*. İ. Ü. Veteriner Fakültesi Yayın No : 4, 1984, İstanbul.
- Pursley GR, Herman HA (1950) Some effects of Hypertonic and Hypotonic Solutions on the livability and morphology of bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 33, 220 - 227.
- Salisbury GW, Kinney WC (1957) Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. III. PH. *J. Dairy Sci.*, 40, 1343 - 1349.
- Salisbury GW, Van Demark NL, Lodge JR (1978) *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. Ed. GW Salisbury WH, Freeman and Company, San Francisco.
- Smith JT, Mayer DT, Herman HA (1953) Osmotic Pressure of Extended Bovine Semen During storage. *Research Bulletin*, 538, 1-20.
- Steinbach J, Foote RH (1969) Osmotic Pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 50, 205 - 213.
- Watson PF, Martin ICA (1976) Artificial insemination of sheep : the effect of semen diluents containig egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology*, 6, 559-564.
- Willett EL, Ohms JI (1958) Inactivation of spermatozoa by lactate and reactivation with alkali. *J. Dairy Sci.*, 41, 275 - 280.
- Würgau TH, Leidl W (1989) Über den Einfluss der Abkühlung sowie des pH- Wertes und der Osmolaritaet des Verdünners auf die Morphologie der Spermien einiger Haustierarten. *Wien. Tierartztl. Mâchr.*, 76, 48 -50.
- Yurdaydın N (1990) Spermının Alınması, Saklanması ve Sun'i Tohumlama. In " *Theriogenoloji* ", Ed. E. Alaçam, 77 - 94, Nuroi Matbaacılık, Ankara.