

ÇEŞİTLİ SPERMA SULANDIRICILARININ SPERMANIN DONDURULMASI VE ERİTİLEN SPERMANIN TEKRAR SULANDIRILMASI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Dr. M. Afif Sevinç - Dr. Harold D. Hafs (1)

İtalyan fizyolojisti L. Spallanzani'nin, 18 nci yüzyılda, sun'i tohumlama yolu ile yavru almanın mümkün olduğunu, köpekler üzerinde yaptığı denemelerle ispat etmesi, durumun aynı yıllarda P. Rossi, 19 ncu yüzyılda W. Heap ve Everret Millais adlarındaki köpek yetiştiricileri tarafından teyidi üzerine, bu metodun çiftlik hayvanlarında uygulanması düşüncesi, 19 ncu yüzyılın sonlarına doğru Avrupa'da ele alındı. O zamanlar, Rusya'da E. I. Ivanoff tarafından başarıyla ve oldukça geniş bir ölçüde çiftlik hayvanlarında uygulanan bu metod, 20 nci yüzyılın başlangıcında Kopenhak'da toplanan Kuzey Bölgesi Hayvancılığı konferansında tartışılırken Sand, bu metodu kullanmada amacın, değerli erkek damızlıkların spermalarından ekonomik bir şekilde faydalanılması olduğunu ileri sürdü. Sand'ın bu pek yerinde olan görüşü, spermanın sulandırılarak çok sayıda dişi tohumlayabilmek düşüncesinin doğmasına yardım ettiği gibi, sulandırılan spermanın, mümkün olabildiği kadar, muhafazası konusunun da ele alınmasına yol açmış oldu.

Zamanımıza kadar çeşitli sperma mahlülleri kullanılarak sulandırılmış spermanın muhafazası konusunda yapılmış sayısız araştırma ve pratik uygulamalar, dölleme gücünü kayıp etmeksizin ve spermanın dondurulmadan üç günden daha fazla muhafaza edilemeyeceğini göstermiş, hattâ iki günden öteye muhafaza edilmiş spermalarla tohumlama yapılmasından daima kaçınılmıştır.

Daha çok sığır sun'i tohumlamasında bahis konusu olan bu durumdan ötürü meydana gelen değerli sperma kaybını önlemek amacıyla, dölleme gücünü kayıptmeksizin spermanın uzun zaman muhafazası için yapılan kesif araştırmalar sonunda, C. Polge et al. (1949), bugün

(1) Adresi : H. D. Hafs, Animal Reproduction Laboratory, Dept. of Dairy, M.S.U., East Lansing, Michigan, U.S.A.

daha da gelişmiş ve başlı başına bir endüstri manzarası arz eden, spermanın - 79°C. de dondurulması metodunu başarıyla kullanarak, dölleme gücünü yitirmeksizin, horozun spermasını dokuz ay süreyle muhafaza edebilen öncüler olmuşlardır.

Dünyanın bir çok yerinde, özellikle, Avrupa ve Amerika'da kısa zamanda geniş bir uygulama alanı bulan bu metodun kısaca dayandığı ana temelleri burada sıralamanın faydalı olacağı kanısındayız.

1 — Spermatozoitlere zarar vermeden, spermanın ısı derecesini, istenilen seviyeye düşürerek, spermatozoitlerin metabolizmasını hemen hemen durdurmak.

2 — Sıfır ve sıfırın altındaki suhunet derecelerinde, spermatozoitlere pek zararlı olan, buz kristallerinin şekillenmesini önlemek.

3 — -79°C. de dondurulmuş spermayı aynı suhunette muhafaza etmek.

4 — Tohumlamayı yapmak için donmuş spermayı, spermatozoitlere zarar vermeyecek şekilde eritmek.

Dondurulacak spermada suhunetin gerekli tekniklerle, tedricen düşürülmesi pek önemlidir. Burada yapılacak teknik bir hata bütün spermatozoitlerin ölmesine sebep olur. Tedrici suhunet düşüklüğünün bahis konusu olduğu alt hudut -20°C. olup, bu derece ile -79°C. arasındaki mesafe sür'atle katedilebilir.

Gliserol, hücre içinde ve dışında buz billürlerinin teşekkülüne mani olmaktadır; ancak spermaya katılacak gliserol nisbetinin, spermatozoitlere zararlı olmayan hudutlar içinde olması ve gliserol kısmını ihtiva eden mahlülün tedricen, spermatozoitlerin gliserollü medyumdan zarar görmeyecek şekilde ve belli tekniklerle ilâvesi şarttır.

Özel ampuller içinde spermanın dondurulmasına geçilmeden önce spermatozoitlerin gliserolle ekilibasyonu'nu temin için; gliserol'ün ilâvesiyle dondurma anı arasında 6-18 saatlik bir zamanın geçmesi şarttır. Aksi halde dondurulacak spermadan istenilen sonuç alınmaz.

Dondurulmuş spermanın eritilmesi, yukarıda sıralanan ana prensiplere dikkatle riayet edildiği takdirde, türlü teknikler ve suhunet dereceleri içinde yapılabilir; 5° - 40°C. lik adi sular bu işi görür. Eritmek için kullanılacak suyun 40° C. den yüksek olmamasına bilhassa dikkat etmek lâzımdır.

Bu konu da, bundan önce yapılan araştırmadan (2) edinilen sonuçlar; 1:5 yumurta sarısı sitrat mahlülünde ve Sm.³te 200 milyon spermatozoit kesafetinde dondurulan boğa spermalarının -79° C. den eritilip Sm.³ te 25 milyon spermatozoit ihtiva edecek şekilde tekrar, türlü mahlüllerle sulandırıldığında, mahlül tipinin gerek, hemen sulandırmayı müteakip gerek, 5° C. de, 48 saatlik süre içinde spermatozoitlerin hareket nisbetlerinde vukua gelen düşüklüğe tesir ettiğini gösterdi. Kullanılan beş mahlül içinde, imansız süt ve Cornell Üniversitesi mahlülleriyle, - 79°C. den eritmeyi müteakip yapılan sulandırmalarda, en yüksek spermatozoit hareket yüzdeleri elde edilmiştir. Öte taraftan bu beş mahlül içinde 5° C. de ve 48 saatlik muhafaza süresi sonunda spermatozoit hareket nisbetindeki düşüklük imansız sütte en az olmuştur.

Bu araştırma, eritildikten sonra donmuş spermanın tekrar sulandırılmasında pek iyi sonuçlar veren imansız süt ve Cornell üniversitesi (CUE) mahlüllerinin, sperma, Sm.³ de 200 milyon spermatozoit tutacak şekilde bu mahlüller ve 1:5 yumurta sarısı sitrat mahlülünde dondurulup eritmeyi müteakip aynı mahlüllerle tekrar sulandırıldığında, yukarıda kayıd edilen iyi etkileri gösterip göstermeyeceğini tespit etmek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metod :

Bu araştırma (Michigan state University) Michigan devlet üniversitesi, sütçülük departmanına bağlı hayvan dölerme lāboratuvarında yapılmıştır. Spermalar (Michigan Artificial Breeders kooperative) Michigan sun'ı yetiştiriciler kooperatifinin türlü ırk bağlarından alınmıştır.

Sperma mahlüllerinde kullanılan yumurta sarısı, fekonde edilmiş, tavukçuluk departmanının gündelik yumurtalarından, imansız süt ise, aynı üniversitenin sütçülük departmanından temin edilmiştir.

Mahlüller, gün aşırı hazırlanmış, imansız süt, 92° C. de 10 dakika tutulduktan sonra kullanılmış, bütün mahlüllere, Sm.³ başına 500 I. U. penisilin ve 500 Mgr. stroptomisin ilāve edilmiştir.

Onsekiz boğa ejakülâtının her birinden 3.36 milyar spermatozoit alınmış; üçe bölündükten sonra (1.12X10⁶), herbirinin Sm.³. de takriben 400X10⁶ spermatozoit bulunacak şekilde ve 35°C. de, Foot ve Dunn

(2) SEVİNÇ, M. A. 1959. Boğa spermasının kesif olarak dondurulması ve eritildikten sonra çeşitli mahlüllerle tekrar sulandırılması üzerinde çalışmalar. (Yayınlanmamış).

tarafından tarif edilen 1:5 yumurta sarısı sitrat, O'Dell ve Almquist tarafından bildirilen imansız süt ve nihayet Foote ve arkadaşlarınca tavsiye edilen Cornell üniversitesi (CUE) mahlülleriyle sulandırılmıştır. 2,8 Sm³. miktarında olan bu sulandırılmış spermaların ısı derecesi takriben birbuçuk saatlik zamanda 5° C. ye düşürülmüştür.

Sperma boğadan alındıktan altı saat sonra, herbir ejakülattan alınan bu üç sperma numünesi (Foote ve Dunn'ın), (O'Dell ve Almquist'in) ve (Foote ve arkadaşlarının) tarif ettikleri gliseröllü 1:5 yumurta sarısı sitrat, imansız süt ve Cornell üniversitesi (CUE) mahlülleriyle bir misli sulandırılarak, spermanın Sm³. de spermatozoit konsantrasyonu 200 X 10⁶ düşürüldü.

Gliserölleme ameliyesinden sonra sperma kimbal cam ampullere 0,7 Sm³. miktarında doldurulmuş, herbir ejakulat ve herbir mahlül başına 7 şer ampul elde edilmiştir. Bu ampuller, Foote ve Dunn'ın tarif ettikleri tekniğe göre boğalardan alındıktan 24 saat sonra dondurulmuş, -79° C. de 24 saat tutulduktan sonra da 5° C. deki suda eritilmiştir.

Eritilen bu sperma ampullerinden herbir ejakulat ve mahlül için 2 şer ampul alınarak bu iki ampul muhtevastından alınan 0,5 Sm³. gliserölsüz 1:5 yumurta sarısı sitrat, imansız süt ve Cornell üniversitesi (CUE) mahlüllerinden biriyle, 5 Sm³. lik tecrübe tüpleri içinde, tekrar sulandırılarak, 4 Sm³. iblâğ edilmiştir.

Spermatozoit hareket yüzdelerinin tespit ve hesapları, herbir tecrübe tüpünden ikişer defa olmak üzere, tekrar sulandırmaya müteakip ve 5° C. de 48 saat muhafazadan sonra yapılmıştır. Bundan başka herbir mahlül ve herbir ejakulatın sperma dondurulmadan hemen önce ve eritildikten hemen sonra yukarda kayıt edilen vitalite nisbetleri, lam üzerine bir damla bu kesif spermadan ve bir damla %, 09 tuz solüsyonu koyarak misroskop altında tespit edilmiştir.

Sperma muayenelerinin mutlak bir objektivizim altında yapılmasını sağlamak maksadiyle, gerek mahlül, gerek ejakulat bakımından hangi numunenin muayene edildiği, muayeneyi yapan şahıs bilmiyordu.

Elde edilen spermatozoit hareket yüzdelerinin varyans analizi aşğıdaki varyasyon kaynaklarını ihtiva etmektedir.

- 1 — Dondurma mahlülü,
- 2 — Tekrar sulandırmada kullanılan mahlüller
- 3 — Muhafaza zamanları
- 4 — Ejakulatlar,

SPERMA SULANDIRICILARI

- 5 — Tecrübe tüpleri,
 6 — Tecrübe tüplerinde hareket nisbetlerinin tesbiti,
 7 — Bu altı esas varyasyon kaynakları arasındaki 13 adet özel karşılıklı tesirler, (İnteractionlar).

Çizelge 1. Eritildikten sonra 5°C. de muhafaza edilen spermalardaki canlı spermatozoit nispetleri

Dondurmada kullanılan mahlüller	Tekrar sulandırmada kullanılan mahlüller	(*)			48 saatte. canlılıkta azalış nispeti
		Muhafaza süresi (saat)			
		0	48	Ort.	
1:5 YS	1:5 YS	43.6	31.1	37.3	12.5
	CUE	45.3	33.8	39.5	11.5
	İmansız süt	39.9	30.4	35.1	9.5
CUE	1:5 YS	32.9	21.1	27.0	11.8
	CUE	33.5	20.7	27.1	12.8
	İmansız süt	26.7	21.7	24.2	5.0
İmansız süt	1:5 YS	29.9	20.1	25.0	9.8
	CUE	32.8	25.4	29.1	7.4
	İmansız süt	26.1	20.4	23.2	5.7

(*) Kesirli rakkamlar tama iblağ edilerek gösterilmiştir.

(YS) Yumurta sarısı sitrat mahlülünün baş harfleridir.

Çizelge II. 5°C. de 48 saatlik muhafaza süresinde canlı spermatozoit yüzdelerinde kayıdedilen düşüş nispetleri ortalamaları

Tekrar sulandırmada kullanılan mahlüller	Dondurmada kullanılan mahlüller			
	1:5 YS	CUE	İmansız süt	Ort.
1:5 YS	12.5	11.8	9.8	11.4
CUE	11.5	12.8	7.4	10.6
İmansız süt	9.5	5.0	5.7	6.7
Ortalama	11.2	9.9	7.6	9.6

CUE, Cornell Üniversitesi mahlülünün rumuzudur.

Sonuçlar ve Tartışma :

Bu araştırmanın yapılması sırasında iki ciddi arıza ya da eksikliğin varlığı açıkça görüldü. Bunlardan biri, Cornell üniversitesi mahlülünün (CUE) terkinde sulfanilamid bulunmasıdır. Bu unsurun spermanın dondurulması anında kötü bir etkiye malik olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Ancak, bu araştırmada Cornell üniversitesi mahlülünün (CUE) kullanılması, bunun herhangi bir tadilâta uğratmaksızın bir bütün olarak ele alınması, ihtiva ettiği sulfanilamid miktarının azlığı sebebiyle fazla kötü bir etki göstermeyeceği düşüncesinden ileri, gelmiştir. İkinci husus, bilinmiyen bazı sebepler yüzünden imansız süt mahlülünün iyi sonuç vermemesidir. Bunun, büyük bir ihtimalle, bu araştırmada kullanılan imansız süt'ün terkinbiyle ve hususıyla imansız sütte, menşei bilinmiyen bazı piresipitan maddelerin teşekkülüne hamiledilebilir.

İmansız süt mahlülünün, bundan önceki araştırma ile bu araştırmada verdiği değişik sonuçlar, bu konuda çalışan bazı araştırmacılar tarafından müşahade edilmiş, diğer bazı araştırmacılar ise böyle durumla karşılaşmamışlardır. İmansız süt mahlülünün kullanılmasıyla elde edilen sonuçların arzettiği bu varyasyonun sebebi bir sır olarak kalmaktadır. Ama, imansız süt yerine süt mahlülü kullanılarak istenilen sonuçlar elde edilebilir.

Üç ayrı mahlülde dondurulan spermaların üçer mahlülle tekrar sulandırılmasından elde edilen sonuçlar çizelge I de gösterilmiştir.

1 — Dondurma mahlülü olarak 1:5 yumurta sarısı sitrat mahlülü, tekrar sulandırmada kullanılan mahlüllerin farklılığına rağmen, sıfır ve 48 saatlik spermatozoit hareket nisbeti bakımından en iyi sonucu vermiştir. Ama, 48 saatlik muhafaza süresince, spermatozoit hareket nisbetindeki düşüklük yönünden de en kötü sonucu bu mahlül vermiştir. Çizelge II de daha açıkça görülecek olan spermatozoit hareket nisbetindeki bu düşüklük, Cornell üniversitesi mahlülünün 26,1 ve imansız süt mahlülünün verdiği 25,8 spermatozoit hareket nisbetlerinden önemli ölçüde daha iyi bulunmuştur ($P' \sim -04$).

2 — Cornell üniversitesi mahlülünün (CUE) eritilen spermayı sulandırmada verdiği ortalama % 31,9 (çizelge IV) spermatozoit hareket nispeti, aynı maksatla kullanılan imansız sütün verdiği % 27,5 hareket nispetinden önemli derecede daha iyi bulunmuş ($P \sim .07$);

SPERMA SULANDIRICILARI

Çizelge III. Varyasyon kaynaklarının varyans unsurları ve F nispetleri

Varyasyon kaynakları (*)	Serbestlik dereceleri	Hesaplanan F nispetleri	F nispetlerinin çizelge değerleri			Varyans unsurlarının genişliği
			% 10	% 5	% 1	
F	2	3.60*	2.47	3.28	5.30	31.3
P	2	2.73	2.47	3.28	5.30	3.0
S	1	158.18**	3.03	4.45	8.40	45.2
FP	4	0.79	2.03	2.50	3.60	-0.3
FS	2	2.99	2.48	3.28	5.29	1.1
PS	2	4.73*	2.48	3.28	5.29	2.4
FPS	4	1.21	2.03	2.50	3.60	0.3
E	17	59.58**	1.52	1.71	2.12	71.0
FE	34	5.46**	1.40	1.54	1.83	16.2
PE	34	8.69**	1.40	1.54	1.83	28.0
SE	17	3.12**	1.52	1.71	2.12	3.5
FPE	68	2.26**	1.31	1.37	1.56	13.7
FSE	34	1.97**	1.40	1.54	1.83	4.8
PSE	34	2.35**	1.40	1.54	1.83	6.7
FPSE	68	1.52*	1.31	1.37	1.56	7.7
T:EFP	162	1.31*	1.19	1.22	1.32	4.1
ST:EFP	162	0.90	1.19	1.22	1.32	-3.5
R:STFEP	648	—	—	—	—	66.7

(*) Kod: F — Dondurma mahlülü, P — Tekrar sulandırmada kullanılan mahlül,

S — Muhafaza zamanı, E — Ejakülat, T — Tecrübe tüpü,
R — Preparatın okunması

Çizelge IV. kullanılan mahlüllerde tespit edilen canlı spermatozoit yüzdelerinin toptan ortalamaları

Tekrar sulandırmada kullanılan mahlüller	Dondurmada kullanılan mahlüller			Ort.
	1:5 YS	CUE	İmansız süt	
1:5 YS	37.4	27.0	25.0	29.8
CUE	39.5	27.1	29.1	31.9
İmansız süt	35.1	24.2	23.3	27.5
Ortalama	37.3	26.1	25.8	29.7

Öte yandan 1:5 yumurta sarısı sitrat mahlülü ise ikisi arasında.
% 29.8 nispetinde bir sonuç vermiştir.

3 — Dondurmada ve eritmeyi müteakip kullanılan mahlüller arasındaki karşılıklı etki (FP), istatistik yönünden önemli bir farkın bulunmadığını gösterdiğine göre, bu iki mahlül gurubunun, etkilerini bağımsız olarak gösterdikleri, ve gene, etkilerinin, kullanılan mahlül çeşitlerine rağmen, ilâve şeklinde olduğu sonucuna varılabilir.

4 — Spermayı sulandırmada kullanılan mahlüllerle, muhafaza zamanı arasındaki karşılıklı etkinin (FS) istatistik yönünden önemli olması ($P = .07$), 5°C. de ve 48 saatlik muhafaza zamanı süresince spermatozoit hareket yüzdelerinde vukua gelecek düşüş nispetinin, sperma, imansız sütte dondurulduğu takdirde, (çizelge II, % 7.6) 1:5 yumurta sarısı sitrat mahlülüne nazaran daha küçük olacağını bekleyebiliriz.

5 — Eritilen donmuş spermanın tekrar sulandırılmasında kullanılan mahlüllerle, bu spermaların muhafaza edildiği zaman arasındaki karşılıklı etkinin (PS) istatistik yönünden önemli bulunması ($P = .02$), 5°C. de ve 48 saatlik muhafaza zamanı süresince spermatozoit canlılık nispetinde vukua gelecek düşüşün, 1:5 yumurta sarısı sitrat mahlülüne bakınca imansız süt mahlülü kullanmakla daha küçük olacağını (çizelge II, % 6.7) göstermektedir.

6 — Spermanın dondurulması ve eritildikten sonra tekrar sulandırılması için kullanılan mahlüllerle muhafaza zamanı arasındaki karşılıklı etkinin (FPS) istatistik yönünden önemsiz olması, yukarıda 4 ncü maddede belirtilen hususun, spermanın dondurulmasında kullanılan mahlülün çeşidine bakmaksızın gerçek olduğunu; 5 nci maddede açıklanan durumun da, spermayı dondurmada kullanılan mahlülün çeşidine rağmen, aynı şekilde gerçek olduğunu göstermektedir.

7 — Ejakülatlar arasında ve muhafaza zamanları arasında kayıd edilen önemli farklarla, ejakült ve diğer kriteriyumlar arasındaki karşılıklı etkilerin (interaction) istatistik yönünden önemli bir durum arz etmeleri, ileride yapılacak bu çeşitten araştırmaların sonuçlarını önceden kestirmede her ne kadar az bir değer taşıyorsa da haiz oldukları değerleri göstermek ve varyasyonu kontrol bakımından önem taşımaktadırlar (çizelge III).

Bu durumlara göre :

1 — Aynı araştırmanın, sulfanilamid ihtiva etmiyen Cornell üniversitesi mahlülü (CUE) ve imansız süt yerine homojenize süt mahlüllerinde spermanın dondurularak tekrarlanması;

2 — Eritilen donmuş spermanın sulandırılmasında kullanılacak mahlüllerin, donmuş sperma için kullanılan mahlüller nisbetinde glicerol ihtiva ederek kullanılması ve aradaki farkın tesbiti,

3 — Halen kullanılmakta olan sperma dondurma mahlülleri muvacehesinde vibrio fetus'un etkisiz hale getirilmediği bilinmektedir; acaba, bu araştırmada kullanılan dondurma tekniğini kullanarak ve eritmeyi müteakip, (gliserol nisbetini düşürmek için) gliserolsüz ama sulfa nilamid ihtiva eden mahlüllerin kullanılması bu hastalık amillerini öldürmez, ya da tesirsiz hale sokmaz mı?

4 — Yumurta sarısı sitrat ve süt mahlülleri karışımından meydana getirilen kombine mahlüllerin kullanıldığı araştırmada (3) alınan sonuçlara bakarak bu çeşit bir mahlülün spermaları dondurma mahlülü olarak kullanılması pek uygun olur.

Özet :

1 — Dondurma mahlülü olarak 1:5 yumurta sarısı sitrat mahlülü ortalama spermatozoit nisbeti bakımından (% 37,3), imansız süt (% 25, 8) ve Cornell üniversitesi mahlüllerinden (% 26,1) daha iyi bir sonuç vermiştir.

2 — Eritilmiş spermanın sulandırılmasında Cornell üniversitesi mahlülü (% 31,9), 1:5 yumurta sarısı sitrat (% 29,8) ve imansız süt mahlüllerinden (% 27,5) daha yüksek bir spermatozoit hareket nisbeti vermiştir.

3 — İmansız süt, gerek spermayı dondurma gerek, eritmeyi müteakip tekrar sulandırma mahlülü olarak 5° C. de 48 saatlik muhafaza süresinde spermatozoit hareket nisbetindeki düşüklük yönünden en iyi sonucu vermiştir.

4 — Spermayı dondurmak için kullanılan mahlüller ile sperma eritildikten sonra tekrar sulandırmada kullanılan mahlüller arasında karşılıklı bir etki olmamış, bir diğer deyimle, dondurmada kullanılan mahlüllerin etkileri, tekrar sulandırmada kullanılan mahlüllerin etkisine ilâve şeklinde tezahür etmiştir.

THE EFFECTS OF VARIOUS DILUENTS ON FREEZING BULL SEMEN AND RE-EXTENDING IT AFTER THAWING

M. Afif Sevinç and Harold D. Hafs (1)

The former experiment² has shown that when sperm are frozen in 1:5 egg-yolk-citrate diluent at a concentration of 200 million per ml.

(3) *Sevinç, M. A. ve Hafs, H. D. 1959. Katalaz Fermenti ihtiva eden çeşitli sperma mahlül kombinasyonlarının, boğa sperması üzerindeki etkileri. (Yayınlanmamış).*

(1) *Current adres : H. D. Hafs, Animal Reproduction Lab., Dept. of Dairy, M.S.U., East Lansing, Mich.*

(2) *M. Afif Sevinç — Preservation and re-extended of frozen bull semen with various diluents after thawing from -79°C. (unpublished).*

and then thawed to be re-extended to 25 million per ml., the type of extender used for re-extension influenced the percent of motile sperm in the semen immediately after re-extension and the decline in motility during post-thawing storage for 48 hours at 5°C. Re-extension with either skimmilk or CUE resulted in the highest initial percentages of motile sperm, but the longevity of the sperm motility during post - thawing storage at 5°C. was considerably higher when the sperm were re-extended in skimmilk.

This experiment is designed to test whether or not the CUE and skimmilk exert their benign effects on the percent of motile sperm when the sperm are frozen in these extenders at a concentration of 200 million per ml. and then thawed to be re-extended in either CUE, skimmilk, or 1:5 egg-yolk-citrate.

MATERIALS AND METHODS

From each of 18 ejaculates, 3.36 billion sperm were split into three equivalents (1.12×10^9 each) and extended at 35°C. to 2.8 ml. in either 1:5 egg-yolk-citrate (described by Foote and Dunn), skimmilk (described by O'Dell and Almquist), or CUE (described by Foote, et al.), giving about 400 million per ml. These semen samples were cooled to 5°C. during a period of about 1.5 hours. Six hours after collection, the three semen samples from each ejaculate were glycerolated, according to the addition procedure of Foote and Dunn, either with the 1:5 egg-yolk-citrate extender (described by Foote and Dunn), the skimmilk glycerol extender (described by O'Dell and Almquist), or with a glycerol extender identical to the CUE (described by Foote et al.) except that it contains 14 % glycerol (V./V.)

After glycerolation, 0.7 ml. aliquots of the extended semen were placed in kimbal glass ampules, giving seven ampules for each extender of each ejaculate. These were frozen according to the freezing procedure of Foote and Dunn about 24 hours after collection; and after 24 hours of storage at -79°C. the semen was thawed in 5°C. water.

After thawing, 0.5 ml. from each of two ampules from each extender for each ejaculate were re-extended to 4.0 ml., in either non-glycerol 1:5 egg-yolk-citrate, non-glycerol skimmilk, or non-glycerol CUE.

Estimates of percentage of motile sperm were made in duplicate from each test tube immediately after re - extension and again after 48

hours of storage at 5°C.. Duplicate motility estimations were also made from each extender for each ejaculate immediately before freezing and immediately after thawing by placing a small quantity of the concentrated semen in a drop of 0.9 % NaCl on a microscope slide.

RESULTS AND DISCUSSION

While the design of this experiment seemed satisfactory, two serious errors became apparent during the course of conducting it. Firstly, the composition of the CUE (The Cornell University Extender) included sulfanilamide, an agent which has long been known to be toxic to sperm during freezing. Secondly, for some unknown reasons, the skimmilk extender resulted in unsatisfactory motilities. Perhaps these were associated with a precipitate of unknown origin which formed in the skimmilk extender.

The deviation of the results observed in the skimmilk extender in this experiment from those predicted on the basis of the first experiment² might have been anticipated from previous experience using skimmilk as an extender. This varying results in the skimmilk extender is observed by many researchers, but it is not found by many others. Its cause remains a mystery, but one apparently can obtain the desired results by using whole milk instead of skimmilk.

Table 1. Percentages of motile sperm during post-thawing storage at 5°C.

Extender used for freezing	Extender used for re-extending	Hours stored after thawing			Decline from 0 to 48 hrs.
		0	48	Average	
1 : 5 YC	1 : 5 YC	43.6	31.1	37.3	12.5
	CUE	45.3	33.8	39.5	11.5
	Skimmilk	39.9	30.4	35.1	9.5
CUE	1 : 5 YC	32.9	21.1	27.0	11.8
	CUE	33.5	20.7	27.1	12.8
	Skimmilk	26.7	21.7	24.2	5.0
Skimmilk	1 : 5 YC	29.9	20.1	25.0	9.8
	CUE	32.8	25.4	29.1	7.4
	Skimmilk	26.1	20.4	23.2	5.7

Table 2. Averages of the decline in percent of motile sperm during storage at 5°C. for 48 hours.

Post-thawing extender	Freezing extender			
	1:5 YC	CUE	Skimmilk	Av.
1:5 YC	12.5	11.8	9.8	11.4
CUE	11.5	12.8	7.4	10.6
Skimmilk	9.5	5.0	5.7	6.7
Average	11.2	9.9	7.6	9.6

The overall averages for nine treatments are shown in Table 1. The 1:5 egg-yolk-citrate freezing extender resulted in the highest motilities, both at zero hours and at 48 hours storages regardless of which extender was used for re-extension. But the 1:5 egg-yolk-citrate freezing extender also had the largest decline in motility during storage for 48 hours. This decline in motility, which is more easily seen in Table 2, was quite similar to that observed in the CUE extender and, as in the former experiment, the skimmilk resulted in the smallest decline.

The results of the statistical analysis are summarized in Table 3 where it may be seen that: (1) The average motility of 37.3 (shown in Table 4.) for the 1:5 egg-yolk-citrate extender was significantly better than the 26.1 for the CUE and the 25.8 for skimmilk ($P < .04$). (2) The average of 31.9% motility (Table 4.) for CUE used as a post - thawing extender was significantly higher than 27.5 % for skimmilk ($P < .07$) with 1:5 egg-yolk-citrate being intermediate in this respect. (3). Since the (FP) interaction did not approach significance, we may conclude that the freezing extender and the post - thawing extender exert their effects independently and that their are simply additive regardless of the extenders used. (4) The significance of the (FS) interaction ($P < .07$) indicates that when sperm are frozen in skimmilk, we may expect a smaller decline (7.6 %, see Table 2) in motility during subsequent storage at 5°C. for 48 hours than when sperm are frozen in 1:5 egg-yolk-citrate diluter. (5) The significance of the (PS) interaction ($P < .02$) indicates that when sperm are re-extended in skimmilk, we may expect a smaller decline (6.7 %, see Table 2) in motility during storage at 5°C. for 48 hours than when sperm are re-extended in 1:5 egg-yolk-citrate extender. (6) The very low level of significance of the (FPS) interaction indicates that the statement made above, under (4) is true regardless of the extender used for re-extension and that the

SEMEN — EXTENDERS

statement made above, under (5) is true also regardless of the extender used for freezing. (7) While the differences observed among ejaculates, between storage times, and in the several interactions between ejaculates and other criteria were significant, these are of little value in predicting results of futur trials, except to point to their value as a metod of controlling variation;

Table 3. F ratios and variance components for the measured sources of variation.

Source of variation (*)	Degrees of freedom	Computed F ratio	Tabular F ratios			Magnitude of variance component
			10 %	5 %	1 %	
F	2	3.60*	2.47	3.28	5.30	31.3
P	2	2.73	2.47	3.28	5.30	3.0
S	1	158.18**	3.03	4.45	8.40	45.2
FP	4	0.79	2.03	2.50	3.60	-0.3
FS	2	2.99	2.48	3.28	5.29	1.1
PS	2	4.73*	2.48	3.28	5.29	2.4
FPS	4	1.21	2.03	2.50	3.60	0.3
E	17	59.58**	1.52	1.71	2.12	71.0
FE	34	5.46**	1.40	1.54	1.83	16.2
PE	34	8.69**	1.40	1.54	1.83	28.0
SE	17	3.12**	1.52	1.71	2.12	3.5
FPE	68	2.26**	1.31	1.37	1.56	13.7
FSE	34	1.97**	1.40	1.54	1.83	4.8
PSE	34	2.35**	1.40	1.54	1.83	6.7
FPSE	68	1.52*	1.31	1.37	1.56	7.7
T:EFP	162	1.31*	1.19	1.22	1.32	4.1
ST:EFP	162.	0.90	1.19	1.22	1.32	-3.5
R:STEFPP	648	—	—	—	—	66.7

(*) Coded : F - Freezing extender, P - Post - thawing extender, S - Storage time, E - Ejaculate, T - Test tube, R - Reading.

Table 4. Overall averages of the percent motile sperm for the nine treatments.

Post-thawing extender	Freezing extender			
	1:5 YC	CUE	Skimmilk	Av.
1:5 YC	37.4	27.0	25.0	29.8
CUE	39.5	27.1	29.1	31.9
Skimmilk	35.1	24.2	23.3	27.5
Average	37.3	26.1	25.8	29.7

In the light of these and other results, it would be beneficial to repeat this experiment considering the followings:

1. Using CUE without sulfanilamide as a freezing extender and using homogenized whole milk instead of skimmilk.

2. The addition of the post-thawing extender without glycerol (as it was done in this experiment) may be detrimental and its effect should be compared with the addition of a post-thawing extender with the same level of glycerol as used in the freezing extender.

3. There is good evidence that vibrio fetus is not controlled in the routine freezing extenders, now used. Is it possible that a freezing technique such as used in this experiment, followed by re-extension without glycerol but with sulfanilamide (so as to lower the glycerol level) might inhibit or even kill this venereal organism?

4. In view of the results obtained from the experiment³ carried out on diluents which were combined by mixing different extenders and used in storing unfrozen bull semen might give valuable results in the case of frozen semen.

SUMMARY

1. The 1:5 egg-yolk-citrate freezing extender resulted in a higher average motility (37.3 %) than did either the skimmilk (25.8 %) or the CUE (26.1 %).

2. CUE post-thawing extender resulted in a higher average motility (31.9 %) than did the 1:5 egg-yolk-citrate (29.8 %) or the skimmilk (27.5 %).

3. The skimmilk, whether used as the freezing extender or the post-thawing extender resulted in a smaller loss of motility during post-thawing storage at 5°C. for 48 hours.

4. The extenders used for freezing did not interact with the extenders used for re-extension. In other words, the effect of the freezing extender was simply additive to the effect of the post-thawing extender.

ACKNOWLEDGMENT

The authors appreciate the valuable assistance of R. C. Knisely and are thankful for the semen samples provided by the people of MABC.

(3) M. Afif Sevinç and Harold D. Hafs — The preservation of bull sperm in milk, CUE and 1:1 combination of these extenders with and without Catalase (unpublished).

REFERENCES

1. Bratton, R. W., and Foote, R. H. 1949-50. Directions for preparing and handling small quantities of Yolk - citrate - sulfaniamide - streptomycin - penicillin extender. Routine Laboratory Procedure Nos. 5a, 6, and 8. Laboratory of Animal breeding, Dept. of Animal Husbandry, Cornell University, Ithaca.
2. Bratton, R. W. et al. 1955. Preliminary fertility results with frozen bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 38:40.
3. Foote, R. H., and Dunn, H. O. 1954. Buffers, extenders and methods for freezing semen. Routine Laboratory Procedure No. 11, Laboratory of Animal breeding, Dept. of Animal Husbandry, Cornell University.
4. Foote, R. H. et al. 1958. Fertility of bull semen stored for one and two days at 5°C. in 20 percent Yolk-Citrate-Glycine-glucose extender.
5. Henderson, C. R. 1955. Design and analysis of animal husbandry experiments. Mimeo., Dept. of Animal Husbandry, Cornell University. *J. Dairy Sci.*, 41:732.
6. Miller, W. J., and Vandemark, N. L. 1954. The influence of glycerol level, various temperature aspects, and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at subzero temperatures. *J. Dairy Sci.*, 37:45.
7. O'Dell, W. T., and Almquist, J. O. 1957. Freezing Bovine semen. I. Techniques for freezing bovine spermatozoa in milk diluents. *J. Dairy Sci.*, 40:1534.
8. Polge, C. et al. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164:666, London.