

KOÇ SPERMASININ DEĞİŞİK SULANDIRICILARDA DONDURULMASI VE İN-VİTRO DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR.¹

Necmettin Tekin²

Anne-Rose Günzel³

Untersuchungen über die Tiefgerierung von Schafsperma mit verschiedenen Verdünnern und in-vitro Beurteilungsverfahren

Zusammenfassung: *In zwei Versuchsreihen wurde Sperma von drei Böcken der Rasse Deutsches Merinofleischschaf im Split-Sample-Verfahren unter Anwendung verschiedener Verdünnern eingefroren und sowohl während des verarbeitungsprozessen als auch nach dem Auftauen im Labor untersucht. Split sample-1 wurde mit Tris-und Test-Magermilch (TesT-M)-Verdünnern, Split Sample-2 mit TesT-M-Verdünnern sowie unter Zusatz von Orvus-Es-Paste (TesT-M | OEP) verarbeitet.*

Als Beurteilungsparameter wurden innerhalb der Laboruntersuchungen die Prozentsätze vorwärtsbeweglicher Samenzellen und normaler Akrosome im Frischsamen, nach Verdünnung, Anpassung und Resuspension und nach dem Auftauen im vierstündigen Thermoresistenztest sowie im Sephadex-Filtertest herangezogen.

In Split Sample-1 war nach Anpassung und Resuspension in den mit Test-M verdünnten Proben der Anteil an vorwärtsbeweglichen Samenzellen höher als in den mit Tris verdünnten Vergleichschargen. Dagegen waren in Prozentsatz normaler Akrosome keine Differenzen erkennbar. Der Zusatz von OEP zum TesT-M-Verdünnern (Split Sample-2) erwies sich als günstig sowohl in bezug auf die Bewegungsaktivität als auch auf die Kopfkappenintegrität der Samenzellen.

1 Bu çalışma, A.Ü. Veteriner Fakültesi ile Hannover Yüksek Veteriner Okulu arasındaki işbirliği çerçevesinde yürütülmüştür. Anfertigt im Rahmen der Universitátspartnerschaft zwischen der Veterinarmedizinischen Fakultät der Universität Ankara und der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Gefördert durch Mittel des BMZ: GTZ-Projekt Nr. 852170. 0-01.100.

2 Yrd.Doç.Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, Ankara.

3 Dr., Klinik für Andrologie und Besamung der Haustiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Nach dem Auftauen und im Verlauf des Thermoresistenztestes zeigten sich in den Proben von split Sample-1 (Tris und TesT-M) für beide Untersuchungskriterien geringe Unterschiede. Demgegenüber war in Split Sample-2 (TesT-M und TesT-M | OEP) im gesamten Thermoresistenztest ein Schutzeffekt der OEP auf die Spermienakrosome feststellbar.

Die Ergebnisse des Sephadex-Filtertests hatten ähnliche Tendenzen. Hinsichtlich des Prozentsatzes filtrierter Samenzellen waren die besten Resultate für die mit Tris-und TesT-M | OEP verdünnten Proben zu verzeichnen. Die gefilterten Samenzellen waren zu einem hohen Prozentsatz durch morphologisch intakte Akrosome charakterisiert.

Özet: *Alman etçi merinos ırkı üç koçtan alınan spermalar çeşitli sulandırıcılar kullanılarak iki seri halinde split ejakülatlar biçiminde dondurulmuş, dondurma evrelerinde ve çözünden sonra laboratuvarında değerlendirilmiştir. Birinci seride Tris ve TesT-M (split sample-1), ikinci seride ise TesT-M ve TesT-M | OEP (split sample-2) sulandırıcıları kullanılmıştır.*

Değerlendirme kriterleri olarak ele alınan motilite ve normal akrosom (%) oranları taze (nativ) spermada, 1. sulandırmadan, alışımdan ve 2. sulandırmadan sonra; çözünden sonra ise, 4 saatlik termoresistenz ve Sephadex filtre testleriyle saptanmıştır.

Birinci seride, TesT-M sulandırıcısı içinde alışımdan ve 2. sulandırmadan sonra saptanan motilite değerleri Tris sulandırıcısından daha yüksek olmuş, buna karşılık normal akrosomlu spermatozoa oranları arasında herhangi bir fark bulunmamıştır. İkinci seride ise, TesT-M | OEP sulandırıcısı içinde saptanan hem motilite, hem de normal akrosom değerleri belirgin bir üstünlük göstermişlerdir.

Çözünden hemen sonra ve termoresistenz test uygulamasında Tris ve TesT-M sulandırıcılarında saptanan değerlendirme kriterleri birbirlerinden çok az farklı değerlerde olmuştur. Ancak, ikinci seride (TesT-M ve Test-M | OEP) sulandırıcıya katılan OEP nin spermatozoaların özellikle akrosomları üzerinde koruyucu etkisi gözlenmiştir.

Sephadex filtre testi ile de benzer sonuçlar elde edilmiş olup, filtre olan spermatozoa (%) oranı bakımından Tris ve TestT-M | OEP sulandırıcıları daha iyi sonuç vermiştir. Süzüntüde saptanan spermatozoonlar ise, büyük oranda normal akrosomlu yapılarıyla karakterize olmuştur.

Giriş

Günümüzde birçok evcil hayvanın spermalarının dondurulması ve dondurulmuş spermayla elde edilen dölverimi memmunluk verici düzeye erişmiş bulunmaktadır. Bir kaç hayvan türünde ise henüz bu sonuçlara erişilememiştir. Ürünleri nedeniyle ekonomik önemi büyük olan koyun, bunlar arasında yer alır. Ancak, koç spermasının başarıyla dondurulması için yapılan araştırmalar, sağlayacağı büyük yararları nedeniyle yoğunluğunu ve güncelliğini korumaktadır.

Taze (nativ) spermayla başarılı ve yaygın koyun tohumlama uygulaması yanında, donmuş spermayla henüz başarılı olunamaması, araştırmacıları spermanın dondurulmasında etkili olabilecek faktörleri araştırmaya yönlendirmiştir. Özellikle, spermanın sulandırılmasında kullanılan solüsyonlar ve donma işleminde zorunlu olarak bulunması gereken kimi maddeler ile çözüm sonrası değerlendirme yöntemleri yapılan araştırmalarda ön sıraları almaktadır.

• Koç spermasını ilk defa dondurmaya deneyen Emmens ve Blackshaw (6), 1950 yılında yaptıkları çalışmalarında, sodyum sitrat sulandırıcısıyla çeşitli şeker ve alkol bileşiklerini denemişlerdir. Araştırmacılar, -79°C de ampulde dondurdukları koç spermalarında en iyi molititeyi, sulandırıcıya % 7.5-10 Gliserin ve % 12.5 Arabinoz, Ramnoz veya Ksiloz katmakla elde ettiklerini bildirmişlerdir. Benzer sonucu elde eden Markovic da (17), sulandırıcı olarak süt-yumurta sarısı, süttozu ve yumurta sarısı-sitrat-fosfat gibi sulandırıcılar kullanarak dondurduğu koç spermalarında çözüm sonrasında % 60-70 motilite saptadığını, sulandırıcıya ilave edilen Glukoz ve Arabinoz'un motiliteyi artırdığını söylemiştir.

Daha sonraki yıllarda yapılan çok sayıda araştırmadan elde edilen sonuçlar da normal dölverimi elde etmekten uzak ve çok değişken olmuştur. Bu durum araştırmacıları çalışmalarında in-vivo olduğu kadar in-vitro değerlendirme yöntemlerini kullanmaya yöneltmiştir. Özellikle, çözüm sonrası değerlendirmelerde, spermatolojik özelliklerden motilite (21) ve akrosom morfolojisi (1,3,18) dölleme (fecondation) sırasındaki önemleri nedeniyle üzerinde en çok durulan konular olmuştur.

Nitekim Dimitropoulos (5), çözüm sonrasında ve $+ 38^{\circ}\text{C}$ lik terioresistenz test süresince saptadığı spermatozoa motilitesi ile spermatozoon'ların dölleme güçleri arasında çok yakın ilişki bulunduğunu bildirmiştir. Jones ve Martin (13) ise, koç spermasının dondurulmasının

da çeşitli sulandırıcılar denemiş ve laktoz sulandırıcısıyla dondurulanlarda spermatozoa motilitesinin daha iyi olduğunu söylemiştir. Lightfoot ve Salamon'da (16), Pellet metoduyla dondurdukları koç spermalarının çözümünde kullandıkları sodyum sitrat ve sodyum sitrat-Glukoz sulandırıcılarını çözümden sonra ve termoresistenz test (+ 37 °C) uygulamasıyla değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, sulandırıcı sırasıyla, motiliteyi çözümden sonra % 41.5 ve 43.3, 2. saatte % 32.6 ve 39.5, 4. saatte de % 19.9 ve 29.4 olarak bulmuşlardır. Colas (4) adlı araştırmacıda, yine koç spermalarını laktoz sulandırıcısı kullanarak payetlerde dondurmuş, çözümden sonra tekrar sulandırmış ve in-vitro olarak + 37 °C de 3 saat süreyle değerlendirmiştir. Araştırmacı, çözüm sonrasında % 46.7, 1. saatte % 36.8 ve 3. saatte de % 18.3'lük motilite saptamıştır.

Healey (11) adlı araştırmacı, koç ve boğa spermalarının çözüm sonrasında ince yapılarını incelemiş ve boğa spermalarında çok az oranda akrosom bozukluğuna rastladığı halde, koç spermalarında bu oranın çok daha büyük olduğunu söylemiştir. Yine koç ve boğa spermalarını çözümden sonra in-vitro olarak akrosom yapıları yönüyle karşılaştıran Watson ve Martin (24) ise, koç spermalarında yalnızca % 11.3 oranında, boğa spermalarında da % 28.7 oranında normal akrosomlu spermatozoa'ya rastlamışlardır. Tasseron, Amir ve Schindler (23) de, donmuş koç spermalarını çözümden sonra ışık ve elektron mikroskoplarında akrosom morfolojisi için değerlendirmişler ve ışık mikroskopunda % 40 oranında, elektron mikroskopunda ise % 70 oranında bozuk akrosomlu hücreye rastlamışlardır. Koç spermalarını Tris sulandırıcısı kullanarak minitüpte donduran Newes (19), + 70°C de çözdüğü spermaları in-vitro olarak değerlendirmiştir. Araştırmacı, + 37°C de tuttuğu spermalarda çözümden hemen sonra, 2. ve 4. saatlerde olmak üzere motilite ve akrosom değerlerini % 55.0 ve 47.88, % 31.92 ve 17.32, % 10.92 ve 10.72 bulmuştur.

Graham ve ark. (10), Sephadex G-15 partikülleri kullanarak koç spermalarını filtre etmişler ve filtreden yalnızca canlı olan spermatozoonların geçtiğini saptamışlardır. Daha sonra bu yöntem üzerinde çalışan Graham, Schmehl ve Evensen (8) ise, Sephadex partiküllerinden oluşan filtreden normal form gösteren ve canlı olan spermatozoonların geçtiğini söylemişlerdir. Öte yandan kimi araştırmacılar da boğa (9), domuz (7) ve koç (12) spermalarını Sephadex filtre testi ile değerlendirmişler, tohumlama ve Sephadex filtre testi sonuçları arasında yakın ilişki bulmuşlardır.

Heuer (12), manda spermasını dondurmak için kullandığı altı değişik sulandırıcıyı Sephadex filtre testi ile in-vitro olarak karşılaştırmıştır. Heuer, çalışmasında, süzüntüde rastladığı en yüksek spermatozoon oranını (% 28.6-33.5) süt içeren sulandırıcılarda, en iyi motiliteyi (% 56-48) ise Tris ve TesT-M sulandırıcılarında bulmuştur. Araştırmacı ayrıca filtreden geçen spermatozoonların %94.7 sinin normal akrosomlu olduğunu ve tohumlama sonuçlarıyla, filtre testi sonuçları arasında yakın ilişkide saptamıştır. Buna karşılık Landa, Almquist ve Amann (15) adlı araştırmacılar en iyi Sephadex filtre testi sonuçlarını süt içeren sulandırıcılarda değil, Tris ve TesT-M sulandırıcılarıyla saptadıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, koç spermaları split ejakülatlar biçiminde çeşitli sulandırıcılarla minitüblerde dondurulmuş, kullanılan sperma sulandırıcılarının in-vitro değerlendirme yöntemleriyle koç spermasının dondurulmasında kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, üç Alman etçi merinos koçtan alınan spermalar kullanılmıştır. Spermalar, koçlardan gün aşırı aralıklarla sun'i vajen yöntemiyle alınmıştır. Her defasında arka, arkaya iki kez sperma alınmış ve aynı koçun spermaları karıştırılarak split sample yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Her seri için, koçlardan alınan toplam 3x22 çift ejakülatta spermatozoid özellikler saptanmış (19); çalışma süresince değerlendirme kriterleri olarak ele alınan spermatozoa motilitesi (%) ve normal akrosom yapısı (%) (14) ise, taze (nativ) spermada ve dondurma evreleri olan ilk sulandırma, alıştırma ve ikinci sulandırma sonunda bulunmuştur. Ayrıca, aynı kriterler çözüm sonrasında termoresistenz ve Sephadex filtre testleriyle de in-vitro olarak değerlendirilmiştir.

Spermanın dondurulması: Koçlardan alınan ejakülatlar iki seri halinde split sample yöntemiyle dondurulmuştur. Birinci seride Tris (2,19) ve TesT-M (12) (Split sample-1), ikinci seride ise TesT-M ve Test-M / OEP (0.5 cm³ OEP + 100 cm³ Test-M) (Split sample-2) sulandırıcıları kullanılmıştır.

Her koçtan alınan çift ejakülatlardan herbiri değerlendirildikten sonra iki eşit parçaya bölünmüş ve her seri için denenen sulandırıcılarla 9 misli sulandırılmıştır. Aynı sulandırıcılarla sulandırılmış sperma yarı-

ları tekrar birleştirilmiş (1. sulandırma) ve ± 5 °C de 2.5 saat tutulmuştur (Alışım). Alışım süresi sonunda spermalar 15 dakika 700 xg de santrifüj edilmiş, çökelti ve üst tarafta kalan sıvı birbirinden dikkatlice ayrılarak, spermatozoon içeren kısım tekrar aynı sulandırıcı ile iki misli sulandırılmıştır (2. sulandırma). Bu işlemler sonunda spermalar minitüblere (22) doldurulmuş ve sıvı azot buharında (-120 °C) dondurulmuştur.

Termoresistenz testi: Spermatozoon'ların in-vitro yaşamdaki motilite ve akrosom yapıları 4 saat süreyle incelenmiştir. Bu amaçla split sample yöntemiyle minitüblerde dondurulan spermalar $+ 70$ °C/8 saniyede çözülmüşler ve $+ 38$ °C lik bir su banyosunda tutulmuşlardır. Çözümünden hemen sonra, 2. ve 4. saatlerde olmak üzere her iki seriden ejakülatlar için yukarıda açıklanan kriterler değerlendirilmiştir.

Sephadex filtre testi: Sephadex süspansiyonu, 20 gr. Sephadex G-15 in 100 ml % 3 lük sodyum sitrat solusyonu içinde oda ısısında 3 saat bekletilmesiyle hazırlanmıştır. İçine az miktarda cam yünü ile tıkaç yapılarak hazırlanan 2.5 cm^3 lük plastik enjektörlere, önceden hazırlanan Sephadex süspansiyonunun homojen karışımından 0.6 cm^3 boşaltılmıştır. Sephadex partiküllerinin düzgün bir sütun oluşturması için, ayrıca 3 cm^3 sodyum sitrat (% 3) ilave edilerek süzölmüştür. Daha sonra 0.05 ve 0.1 cm^3 spermalar otomotik pipetlerle bu Sephadex sütunu üzerine konmuş ve hemen 2.5 cm^2 sodyum sitrat (% 3) ilave edilerek süzme işlemi (filtration) yapılmıştır (12).

Her seriden ejakülatların süzülme işlemleri sonunda, süzüntüde ve kontrol kısmında spermatozoon sayısı, motilite ve normal akrosom değerleri split sample yöntemine uygun olarak hesaplanmıştır.

Araştırmada elde edilen bulgular t testi, varyanz analizi ve Tukey testi ile karşılaştırılmıştır (20).

Bulgular

Çalışmada kullanılan ejakülatlarda saptanan motilite (%) ve normal akrosom (%) değerlerinin nativ ve sulandırılmış spermalar-daki ortalamaları Tablo 1 ve 2 de verilmiştir. Tablo 1 den izleneceği gibi, birinci seride kullanılan ejakülatlarda başlangıçta (nativ) % 82.23 olan ortalama motilite, bu seride kullanılan Tris ve Test-M sulandırıcıları için 1. sulandırmadan sonra % 78.56 ve 79.77, alışımdan sonra % 76.06 ve 77.81 ($P < 0.05$), 2. sulandırmadan sonra ise % 74.31 ve 76.75 ($P < 0.01$) olmuştur. Aynı spermalarda saptanan normal

akrosom yapısına sahip spermatozoa (%) ortalamaları ise nativ spermada % 96.47, alışımdan sonra % 90.32 ve 90.32 ve 90.56, 2. sulandırma sonrasında da % 88.75 ve 89.15 bulunmuştur.

Tablo 1. Nativ ve sulandırılmış (Tris ve Test-M) spermada saptanan motilite ve normal akrosom değerleri (Split Sample-1).

	Nativ spermada	Sulandırılmış sperma					
		1. Sulandırmadan sonra		Alışımdan sonra		2. Sulandırmadan sonra	
		Tris	Test-M	Tris	Test-M	Tris	Test-M
Motilite X (%) ±S	82.23 4.37	78.56 3.79	79.77 3.66	76.06 4.34	77.81 ⁺ 4.54	74.31 4.19	76.75 ⁺⁺ 4.34
Normal akrosom X (%) ±S	96.47 1.56	— —	— —	90.32 3.83	90.56 4.13	88.75 3.93	89.15 3.48

n = 66 — = P < 0.05 ++ = P < 0.01

İkinci seride kullanılan ejakülatlarda saptanan ortalama % 82.29 luk motilite değeri, Test-M ve Test-M/OEP solüsyonlarıyla sulandırdıktan sonra 1. sulandırma, alışım ve 2. sulandırma evreleri sonunda % 78.40 ve 78.56, 77.80 ve 79.16, 76.21 ve 78.03 (P < 0.05) olmuştur. Bu seri ejakülatlarında % 95.30 olarak bulunan normal akrosomlu spermatozoa oranları ortalamaları ise Test-M ve Test-M/OEP sulandırıcıları için alışım ve 2. sulandırma sonrasında % 90.95 ve 92.96 (P < 0.01), 90.20 ve 92.66 (P < 0.001) bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Nativ ve sulandırılmış (Test-M ve Test-M/OEP) spermada saptanan motilite ve normal akrosom değerleri (Split Sample-2).

	Nativ spermada	Sulandırılmış sperma					
		1. Sulandırmadan sonra		Alışımdan sonra		2. Sulandırmadan sonra	
		Test-M	Test-M OEP	Test-M	Test-M OEP	Test-M	Test-M OEP
Motilite X (%) ±S	82.29 3.98	78.40 4.03	78.56 4.27	77.80 4.30	79.16 4.68	76.21 3.82	78.03 ⁺ 4.63
Normal X akrosom (%) ±S	95.30 1.59	— —	— —	90.95 2.98	92.96 ⁺⁺ 2.38	90.20 3.37	92.66 ⁺⁺⁺ 2.13

n = 66 + = P < 0.05 ++ = P < 0.01 +++ = P < 0.001

Her iki seride dondurulan spermalarla termoresistenz test uygulamaları süresince, çözümden hemen sonra, 2. ve 4. saatlerde saptanan motilite (%) ve normal akrosom (%) ortalama değerleri Tablo 3 ve 4 de gösterilmiştir. Tablo 3'de görüldüğü gibi, Tris ve Test-M sulandırıcıları ile dondurulan spermalarda (split sample-1) çözümden hemen sonra sulandırıcı sırasıyla % 54.83 ve 55.00 olan ortalama motilite, 4 saat sonra % 27.16 ve 10.72 ($P < 0.05$) olmuştur. Aynı spermalarda normal akrosom (%) ortalaması ise, çözüm sonrası % 77.56 ve 77.13 iken, 4. saatte % 55.26 ve 54.61 bulunmuştur.

Tablo 3. Tris ve Test-M sulandırıcılarıyla doldurulan koç spermalarının termoresistenz test (+ 38 °C) süresince motilite ve normal akrosom değerleri.

Değerlendirme zamanı (saat)	Motilite (%)				Normal akrosom (%)			
	Tris		Test-M		Tris		Test-M	
	\bar{X}	$\pm S$	\bar{X}	$\pm S$	\bar{X}	$\pm S$	\bar{X}	$\pm S$
0	54.83	7.59	55.00	9.28	77.56	4.97	77.13	6.50
2	43.66	4.90	41.66	12.82	65.85	5.99	63.43	5.82
4	27.16 ⁺	10.72	19.00	13.60	55.26	6.64	54.61	8.53

n = 30 + = P < 0.05

Test-M ve Test-M / OEP ile dondurulan spermalarda (split sample-2) çözümden sonra saptanan % 56.50 ve 58.00 lik motilite değerleri 4. saatte % 25.83 ve 33.50 olmuştur. Normal akrosom değerleri ise, çözüm sonrasında % 73.95 ve 80.25 ($P < 0.001$) iken 4. saatte % 52.78 ve 62.21 olarak saptanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. Test-M ve Test-M / OEP sulandırıcılarıyla dondurulan koç spermalarının termoresistenz test (+ 38 °C) süresince motilite ve normal akrosom değerleri.

Değerlendirme zamanı (saat)	Motilite (%)				Normal akrosom (%)			
	Test-M		Test-M / OEP		Test-M		Test-M / OEP	
	\bar{X}	$\pm S$	\bar{X}	$\pm S$	\bar{X}	$\pm S$	\bar{X}	$\pm S$
0	56.50	7.08	58.00	6.51	73.95	5.17	80.25 ⁺⁺⁺⁺	6.27
2	44.16	9.00	47.66	8.87	62.21	6.91	73.01 ⁺⁺⁺	6.02
4	25.83	10.67	33.50 ⁺	13.90	52.78	6.89	62.21 ⁺⁺⁻	8.37

n = 30 + = P < 0.05 +++ = P < 0.001

Birinci ve ikinci seride split ejakülatlar biçiminde dondurulan spermaların Sephadex filtration testi ile in-vitro olarak değerlendirilmeleri Tablo 5,6 ve 7 de gösterilmiştir. Tablo 5 ve 6 da split ejakülatların 0.1 ve 0.05 cm³ lük miktarlarıyla uygulanan süzme (filtration) işlemleri sonunda filtre olan spermatozoa (%) si ile süzüntü ve kontrolde olmak üzere motilite (%) ve normal akrosom (%) ortalamaları verilmiştir. Tablo 7'de ise, aynı değerlendirmeler yalnızca her iki seride kullanılan sulandırıcılar için hesaplanarak verilmiştir.

Tablo 5. Tris ve Test-M sulandırıcılarıyla dondurulan koç spermalarının Sephadex filtre testi sonuçları.

Sulandırıcı	Sperma miktarı (cm ³)	Filtre olan spermatozoa (%)	Süzüntü		Kontrol	
			Motilite (%)	Normal akrosom (%)	Motilite (%)	Normal akrosom (%)
Tris	0.1	48.88 ^a	56.67 ^e	81.54 ⁱ	54.33 ^m	53.00 ^r
	0.05	49.92 ^b	53.67 ^f	85.43 ^j	55.00 ⁿ	52.36 ^s
Test-M	0.1	42.65 ^c	52.53 ^g	73.17 ^k	51.00 ^o	50.43 ^t
	0.05	43.85 ^d	51.07 ^h	78.03 ^l	51.00 ^p	52.73 ^u

ab = önemsiz ef = önemsiz ij = P < 0.01 mn = önemsiz rs = önemsiz
ac = P < 0.01 eg = " ik = P < 0.01 mo = P < 0.05 rt = "
bd = P < 0.01 fh = " jl = P < 0.01 np = P < 0.01 su = "
cd = önemsiz gh = " kl = P < 0.01 op = önemsiz tu = "

Tablo 6. Test-M ve Test-M/OEP sulandırıcılarıyla dondurulan koç spermalarının Sephadex filtre testi sonuçları.

Sulandırıcı	Sperma miktarı (cm ³)	Filtre olan spermatozoa (%)	Süzüntü		Kontrol	
			Motilite (%)	Normal akrosom (%)	Motilite (%)	Normal akrosom (%)
Test-M	0.1	42.27 ^a	47.40 ^e	73.00 ⁱ	50.33 ^m	54.23 ^r
	0.05	38.20 ^b	47.73 ^f	73.08 ^j	49.00 ⁿ	55.27 ^s
Test-M/OEP	0.1	51.87 ^c	78.00 ^g	93.64 ^k	55.33 ^o	62.93 ^t
	0.05	54.50 ^d	79.87 ^h	94.04 ^l	55.00 ^p	63.60 ^u

ab = P < 0.01 ef = önemsiz ij = önemsiz mn = önemsiz rs = önemsiz
ac = P < 0.01 eg = P < 0.01 ik = P < 0.01 mo = P < 0.01 rt = P < 0.01
bd = P < 0.01 fh = P < 0.01 jl = P < 0.01 np = P < 0.01 su = P < 0.01
cd = önemsiz gh = önemsiz kl = önemsiz op = önemsiz tu = önemsiz

Tablo 7. Çeşitli sulandırıcılarla dondurulan koç spermalarının (Splitsample -1 ve -2) Sefhadex filtre testi sonuçları

Sulandırıcı	Filtre olan spermatozoa (%)	Süzüntü		Kontrol	
		Motilite (%)	Normal akrosom (%)	Motilite (%)	Normal akrosom (%)
Tris	49.40 ^a	55.17 ^c	83.49 ^e	54.67 ^g	52.68 ⁱ
Test-M	43.25 ^b	51.80 ^d	75.60 ^f	51.00 ^h	51.58 ^j
Test-M	40.24 ^k	47.57 ^m	73.04 ^o	49.67 ^r	54.75 ^t
Test-M / OEP	53.19 ^l	78.93	93.87 ^p	55.17 ^s	63.27 ^u

ab = P < 0.01 cd = önemsiz ef = P < 0.01 gh = P < 0.01 ij = önemsiz
kl = P < 0.01 mn = P < 0.01 op = P < 0.01 rs = P < 0.01 tu = P < 0.01

Tartışma ve Sonuç

Birinci seride üç koçtan alınan toplam 66 çift ejakülatta saptanan ortalama % 82.33'lük spermatozoa motilitesi, Tris ve Test-M sulandırıcılarıyla split ejakülat biçiminde sulandırıldıktan sonra (split sample-1) yaklaşık % 4 lük bir azalma göstermiştir. Alışım ve 2. sulandırma evreleri sonunda ise azalma Test-M sulandırıcısıyla daha az, Tris sulandırıcısıyla ise daha çok olmuştur. Tablo 1'den de izleneceği gibi bu fark, Test-M sulandırıcısı lehine önemli bulunmuştur. Aynı seride saptanan ortalama % 96.47 lik normal akrosom bulgusu ise, 2. sulandırma sonunda yaklaşık % 5 lik azalma göstermiş ve her iki sulandırıcı arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır.

Test-M ve Test-M / OEP sulandırıcılarının kullanıldığı (split sample-2) ikinci seride saptanan ortalama % 82.29 luk motilite, Test-M ve Test-M / OEP sulandırıcıları ile sulandırıldıktan sonra birinci seride olduğu gibi yaklaşık % 4 lük bir düşüş göstermiş, 2. sulandırma sonrasında ise Test-M sulandırıcısında % 76.21, Test-M / OEP sulandırıcısında ise % 78.03 (P < 0.05) olmuştur. Bu seri ejakülatlarında başlangıçta saptanan normal akrosom değeri (% 95.30) ise, Test-M / OEP lehine olmak üzere, alışımdan sonra (P < 0.01) ve 2. sulandırma sonrasında (P < 0.001) önemli farklılıklar göstermiştir.

Yukarıda açıklanan, her iki serideki split ejakülatların dondurma evrelerinde birbirine yakın ve de farklı motilite ve normal akrosom değerleri, kullanılan farklı sulandırıcılardan ileri gelmiştir. Çünkü, çalışmada sonuçları etkileyebilecek faktörler (sperma, çevre koşulları,

farklı maniplasyon ve işlemler vb.) her iki sulandırıcı içinde, hemen hemen aynı tutulmuştur.

Çözümünden hemen sonra saptanan motilite değerleri, her iki seride kullanılan sulandırıcılar arasında da önemsiz ayrılıklar göstermemiştir. Ancak, termoresistenz test uygulamasının 2. ve 4. saatlerinde birinci seride Tris ve ikinci seride de Test-M / OEP sulandırıcıları için önemli sayılabilecek ($P < 0.05$) motilite üstünlüğü gözlenmiştir (Tablo 3 ve 4).

Termoresistenz test uygulaması süresince saptanan normal akrosomlu spermatozoon'lar ,birinci seride kullanılan split ejakülatlar arasında önemsiz, ikinci seride kullanılanlar arasında ise çok önemli ($P < 0.001$) derecede farklı değerlerde olmuştur.

Çözüm sonrasında split ejakülatlar arasında saptanan önemli veya önemsiz farklı değerler, büyük ölçüde, kullanılan sulandırıcıların spermatozoonlar üzerindeki farklı etkilerinden ileri gelmiş olabilir.

Bu araştırmada, saptanan % 54.83-58.00 lik çözüm sonrası motilite değerleri, Markovic'in (17) % 60.7 lik bulgusundan daha düşük olmasına karşın, Lighfoot ve Salamon'un (16) % 41.5-43.3 lük, Colas'ın (4) % 46.7 lik motilite değerlendirmelerinden daha yüksek, News'in (19) % 55.0 lik değeriyle ise benzerlik göstermiştir. Öteyandan, çözüm sonrasında saptanan normal akrosom değerleri de (% 73.95-80.25), bu konularda çalışan araştırmacıların (19,23,24) bulgularından çeşitli ölçülerde yüksek bulunmuştur.

Değişik araştırmacılar tarafından elde edilen birbirlerinden farklı sonuçlar, farklı hayvan materyali ve çalışma koşullarından kaynaklanmıştır.

Her iki seride dondurulan spermaların Sephadex filtre testi ile değerlendirilmelerinde termoresistenz test sonuçlarına benzer veriler elde edilmiştir. Şöyleki, birinci seride Tris ve ikinci seride ise Test-M / OEP sulandırıcıları ile dondurulan spermalarla yapılan filtre işlemleri sonunda, süzüntüde en yüksek motilite ve normal akrosom değerleri saptanmıştır. Ancak, filtre olan spermatozoa %si ile, aynı spermaların kontrol kısımlarındaki motilite ve normal akrosom değerleri karşılaştırıldığında, Graham ve ark. (10) ile Graham, Schmehl ve Evensen'in (8) ileri sürdükleri filtre işlevine tam uyum göstermemiştir. Bu durum, araştırmacılarından ve değerlendirme ölçülerinden kaynaklanmış olabileceği gibi,

değişik araştırmacılarca denenerek işlerliği ortaya konması gereken bir konudur. Aynı şekilde, spermayı in-vitro olarak Sephadex filtre testi ile değerlendiren diğer araştırmacıların (7,12,15) bu araştırma sonuçlarından farklı olan bulguları da benzer nedenlerden ve değişik hayvan türlerinden kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak, koç spermaları split ejakülatlar biçiminde Tris ve Test-M, Test-M ve Test-M / OEP sulandırıcıları içinde dondurulmuş, çözüm sonrasında termoresistenz ve Sephadex filtre testleriyle değerlendirilmiştir. İn-vitro değerlendirmeler sonunda, Tris ve Test-M / OEP sulandırıcıları spermatozon'lar üzerinde daha etkili bulunmuştur.

Ancak, in-vitro değerlendirme yöntemlerinin asıl amaç olan dölvrimiyle olan ilişkisini ortaya koyan çalışmaların yapılmasıyla daha çok önem kazanacağı da bilinmektedir. Böylece, günümüze değin başarılı olunamayan koç spermasının dondurulması konusunda daha yoğun ve etkin çalışmalar yapılabilecektir.

Kaynaklar

1. Allison, A.C. and Hartree, E.F. (1970). *Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in the fertilization*. J. Reprod. Fertil., 21: 501-515.
2. Andersen, K., Aamdal, J. and Fougner, J.A. (1973). *Intrauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep*. Zuchthygiene, 8: 113-118.
3. Brown, C.R. (1975). *Distribution of hyaluronidase in ram spermatozoa*. J. Reprod. Fertil., 45: 125-126.
4. Colas, G. (1975). *Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen*. J. Reprod. Fertil., 42: 277-285.
5. Dimitropoulos, E. (1967). *La signification du test de la thermoresistance dans l'appréciation de la valeur fécondante du sperma congelé*. Ann. Mc'd. Vet., 11: 215-224.
6. Emmens, C.W. und Blackshaw, A.W. (1950). *The low temperature storage of ram, bull and rabbit spermatozoa*. Aust. Vet. J., 26: 226-228.
7. Fayemi, E.O., Crabo, B.G. Graham, E.F. (1979). *Assay of frozen boar semen with Sephadex filtration*. Theriogenology, 12, 13-17.
8. Graham, E.F., Schmehl, M.K.L. and Evensen, B.K. (1978). *An overview of column separation of spermatozoa*. Proc. 7th Techn. Conf. Art. Insem, Madison, WI, 69-73.
9. Graham, E.F. Schmehl, M.K.L., Evensen, B.K. and Nelson, D.S. (1978). *Viability assays for frozen semen*. Cryobiology, 15: 242-244.

10. **Graham, E.F., Vazquez, I.A., Schmehl, M.K.L. and Evensen, B.K.** (1976). *An assay of semen quality by use of Sephadex filtration*. 8. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., Crocow, 4: 896-899.
11. **Healey, P.** (1969). *Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals*. J. Reprod. Fertil., 18: 21-27.
12. **Heuer, C.** (1980). *Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von Wasserbüffelsperma unter Anwendung des Filtertests zur Samenbeurteilung*. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.
13. **Jones, R.C. und Martin, I.C.A.** (1965). *Deep - freezing ram spermatozoa: The effects of milk, yolk-citrate and synthetic diluents containing sugar*. J. Reprod. fertil., 10: 413-423.
14. **Krause, D.** (1966). *Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde*. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Habil. - Schr.
15. **Landa, C.A., Almquist, J.O. and Amann, R.P.** (1980). *Factors influencing Sephadex separation of bovine and ovine spermatozoa*. J. Dairy Sci., 63: 277-282.
16. **Lightfoot, J. and Salamon, S.** (1969). *Freezing ram spermatozoa. III. The effects of pellet volume, composition of the thawing solution and reconcentration of the thawed semen on survival of spermatozoa*. Aust. J. Biol. Sci., 22: 1561-1572.
17. **Marković, B.** (1956). *Einige Unterlagen über die Konservierung und Tiefkühlung von Widdersperma*. Wien. Tierärztl. Monatschr., 45: 48.
18. **Morton, D.B.** (1975). *Acrosomal enzymes, immunochemical localisation of acrosin and hyaluronidase in ram spermatozoa*. J. Reprod. Fert., 45: 375-378.
19. **Newes, J.P.** (1980). *Untersuchungen zur Samenübertragung beim Schaf unter besonderer Berücksichtigung der Spermatiegefrierkonservierung*. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.
20. **Robert, G.D.S., James, H.T.** (1960). *Principles and procedures of statistics*. Mc Graw-Hill Book Company inc. U.S.A.
21. **Salamon, S.** (1974). *Die künstliche Besamung beim schaf*, 99-121. In: Paufler, S.K. und Mitautoren (Hrsg.). "Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch" verlag schaper, Hannover.
22. **Simmet, L.** (1972). *Ein vollautomatisches Verfahren zur Konfektionierung von Bullensperma in Kunststoffröhrchen nach der Landshuter. Methode 7*. Internat. Kongr. tier. forgtl. Hanstierbes., münchen, 2: 1357-1362.
23. **Tasseron, F., Amir, D. and Schindler, H.** (1977). *Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing*. J. Reprod. Fertil., 51: 461-462.
24. **Watson, P.E. and Martin, I.C.A.** (1972). *A comparison of changes in the acrosomes of deep frozen ram and bull spermatozoa*. J. Reprod. Fertil., 28: 99-101.