

DEĞİŞİK SÜRE VE ISILARDA ÇÖZÜLMÜŞ DONMUŞ AYGIR SPERMASININ  
BAŞLICA SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Nafiz Yurdaydın<sup>1</sup>

Werner Pohl<sup>2</sup>

Der Einfluss verschiedener Auftautemperaturen bzw.-zeiten auf die Qualität von  
Tiefgefriersamen des Hengstes

**Zusammenfassung:** *In dieser Arbeit werden die Auswirkungen von verschiedenen Auftauvarianten auf Tiefgefriersamen untersucht. Aus insgesamt 30 Ejakulaten von 6 Warmbluthengsten der Bundesanstalt für Pferdezucht Stadl-Paura wurden 300 Samenportionen für die Untersuchungen herangezogen.*

*Nach der ersten Beurteilung von Volumen, Farbe und Fremd Beimengungen wurde das Ejakulat durch Mehrschichtige Gazelagen filtriert und vorhandenes Sekret der Samenblasendrüsen weitgehend entfernt.*

*Für die Tiefgefrierung wurde Laktose-Merck-Eidotter-Glycerin Verdünnemedium verwendet. Die Ejakulate wurden nicht zentrifugiert, jeweils nach der Verdünnung wurde neuerlich der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien durch Schätzung im Mikroskop beurteilt, die anschließende Portionierung erfolgte in Makropailletten (Makrotüb) Nach 20 minutiger Lagerung bei Raumtemperatur wurden die Pailletten horizontal über Stickstoffdampf 20 Minuten eingefroren, anschliessend erfolgte die Sturzkühlung in flüssigen Stickstoff auf - 196 Grad Celsius.*

*Für das Auftauen der Pailletten im Wasserbad wendeten wir folgende Verfahren an 1. 30 sek. bei 40, 45, 50 und 55 Grad; 2. 35 sek. bei 40, 45, 50 und 55 Grad; 3. 40 sek. bei 40, 45, 50 und 55 Grad Celsius.*

*Der durchschnittliche Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien wurde für die Auftauvariante 1. 26.40, 42.80, 41.00 und 30.80 %; 2. 25.60, 29.81, 45.00 und 30.38 %; 3. 30.20, 35.80, 49.00 und 39.40 %; festgestellt.*

<sup>1</sup> Yrd. Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup> Dr. Med. Vet., Bundesanstalt für Pferdezucht, Stadl-Paura.

*Der Anteil toter Spermien betrug für die Aufstauvariante 1. 51.80, 37.80, 37.00 und 32.28 %; 2. 48.50, 41.50, 35.50 und 39.80 %; 3. 46.94, 39.92, 34.22 und 36.00 %.*

*Der Prozentsatz morphologisch abweichender Formen wurden für die Aufstauvariante 1. 40.88, 30.68, 34.68 und 36.92 %; 2. 32.86, 28.05, 23.88 und 30.00 %; 3. 42.18, 32.76, 25.52 und 35.98 % festgestellt.*

**Özet:** *Bu çalışmada, Stadl-Paura aygır deposundaki 6 Sıcak Kanlı aygırın 30 ejakülatına ait donmuş spermalarından 300 makrotüp değişik çözme süre ve ısıda çözülerek spermatolojik özellikleri incelenmiştir.*

*Alınan ejakülatlar, jell kısmı ayrılıp ilk değerlendirmesi yapıldıktan sonra, santrifüje edilmeden Laktöz-Merck-Yumurta Sarısı-Gliserin sulandırıcısı ile sulandırılıp makrotüplere çekilmiştir. Makrotüplerde oda sıcaklığında 20 dakika bekletilen spermalar, sıvı azot buharında dondurularak - 196 °C de sıvı azot içinde depo edilmiştir.*

*Donmuş spermalar, su banyosunda 1. 30 saniyede 40, 45, 50 ve 55 °C; 2. 35 saniyede 40, 45, 50 ve 55 °C; 3. 40 saniyede 40, 45, 50 ve 55 °C lerinde çözülmüştür.*

*Bu spermaların, çözüm sonu toplam ortalama spermatozoon motilitesi (tek yönlü hareket eden spermatozoonların yüzdesi) 1, 2 ve 3. çözme süre ve ısıları için sırasıyla, % 26.40, 42.80, 41.00 ve 30.80; 25.60, 29.81, 45.00 ve 30.38; 30.20, 35.80, 49.00 ve 39.40 olarak saptanmıştır.*

*Toplam ortalama ölü spermatozoon oranları (%) ise, 1, 2 ve 3. çözme süre ve ısıları için sırasıyla, 51.80, 37.80, 37.00 ve 42.28; 48.50, 41.50, 35.50 ve 39.80; 46.94, 39.92, 34.22 ve 36.00 olarak bulunmuştur.*

*Çözülen bu spermaların, toplam ortalama anormal spermatozoon oranları (%) da, 1, 2 ve 3. çözme süre ve ısıları için sırasıyla, 40.88, 30.68, 34.68 ve 36.92; 32.86, 28.05, 23.88 ve 30.00; 42.18, 32.76, 25.52 ve 35.98 olarak elde edilmiştir.*

## Giriş

Aygır spermasında uzun çalışmalar sonucu değişik sulandırıcılarla sulandırılarak boğa sperması gibi dondurulabileceği ve bu spermalarla yapılan tohumlamalardan normal bir dölverimi alınabileceği bir çok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (2, 4, 6, 7, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 22).

Aygır spermastını pellet yöntemiyle donduran Klug ve ark. (8) bu spermastların çözömlü sonu motilite oranını % 40; Bader ve Mahler (3) % 50; Krause ve Grove (10) ise, % 50-70 olarak elde etmişlerdir.

Nishikawa ve ark. (13) payet yöntemiyle dondurukları aygır spermastlarının çözömlü sonu motilite oranını % 80; Kozandağı ve İşler (9) de, aynı yöntemle dondurdukları aygır spermastının çözömlü sonu motilite oranını % 40 olarak saptamışlardır.

Öteyandan, aygır spermastını plastik tüplerde donduran Aliev (1) çözömlü sonu spermatozoon motilite oranını % 50; spermastları makrotüpde donduran Oliveira (14) % 45 olarak elde etmişlerdir.

Braun ve ark. (5) Sıcak Kanlı (Warmblut) ve Arap aygırlarının spermastlarını makrotüplerde dondurup 45 saniye süreyle 50 °C de çözerek çözömlü sonu motilite oranlarını sırasıyla % 55 ve 33; Sevinç ve ark. (19) ise, Safkan Arap ve Haflinger aygırlarının spermastlarını makrotüpde dondurup, 40 saniye süreyle 50 °C de çözerek, spermatozoon motilite oranlarını sırasıyla, % 47.58 ve 49.99 olarak bulmuşlardır. Yurdaydın ve ark. (21) da, Haflinger ve Nonius ırkından aygırların spermastlarını makrotüpde dondurup, 30 saniye süreyle 45 °C de çözerek bu spermastların çözömlü sonu spermatozoon motilite oranlarını sırasıyla % 26.80, 33.70 ve 45.40 olarak saptanmışlardır.

Bu çalışma, gelecekte tohumlamada sürekli bir biçimde kullanılacak ve dölvörimini büyük ölçüde etkileyecek olan donmuş aygır spermastının, spermatozoon motilite ve anormal spermatozoon oranlarının hangi çözömlü süre ve ısısında daha iyi olduğunu ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

### Materyal ve Metot

Araştırmada materyal olarak Avusturya'nın Stadl-Paura aygır deposundaki 6 Sıcak Kanlı (Warmblut) aygırdan sun'i vajen yöntemiyle alınan toplam 30 ejakülat sperma kullanıldı.

Alınan ejakülatların başlıca spermastolojik özellikleri saptandıktan sonra, santrifüje edilmeden Laktoz-Merck-Yumurta Sarısı-Gli-serin sulandırıcısı ile 1/3 oranında sulandırılarak 4 cm<sup>3</sup> hacmindeki makrotüplere dolduruldu. Daha sonra, bu spermastlar oda sıcaklığında 20 dakika tutulduktan sonra, sıvı azot buharında dondurulup, -196 °C de sıvı azot içinde depo edilmiştir.

Tablo 1. 6 Sıcak Kanlı aygırın donmuş spermalarının değişik çözme süre ve ıslarda çözümlenerek elde edilen ortalama spermatozojik değerleri.

Pa	Nativ Ejekülat	Donmuş Spermayı çözme süre ve ısı												
		30'' 40°C	30'' 45°C	30'' 50°C	30'' 55°C	35'' 40°C	35'' 45°C	35'' 50°C	35'' 55°C	40'' 40°C	40'' 45°C	40'' 50°C	40'' 55°C	
Motilitic Oran (%)	V	51.60	26.40	42.80	41.00	30.80	25.60	29.81	45.00	30.38	30.20	35.80	49.60	39.40
	O	19.50	16.00	12.20	14.00	17.80	16.00	13.51	11.87	16.90	18.20	16.00	13.40	16.20
	U	28.90	57.60	45.00	45.00	51.40	58.40	56.68	43.13	52.72	51.60	48.20	37.00	44.40
Ölü Spermatozoon Oranı (%)		25.40	51.80	37.80	37.00	42.28	48.50	41.50	35.50	39.80	46.94	39.92	34.22	36.00
Anormal Spermatozoon Oranı (%)		27.80	40.88	30.68	34.68	36.92	32.86	28.05	23.88	30.00	42.18	37.76	25.52	35.98

V = Tek yönlü hareket eden spermatozoon oranı

O = Kendi etrafında dönen spermatozoon oranı

U = Hareketsiz spermatozoon oranı

Bu spermallerden, 1.30 saniyede 40, 45, 50 ve 55 °C; 2.35 saniyede 40, 45, 50 ve 55 °C ve 3.40 saniyede 40, 45, 50 ve 55 °C lerinde, her çözme süre ve ısı için 25'er olmak üzere toplam 300 makrotüp su banyosunda çözülerek, donmuş spermaların çözüm sonu başlıca spermatolojik özellikleri (spermatozoon motilitesi, ölü spermatozoon oranı ve anormal spermatozoon oranı) saptanmıştır.

### Bulgular

Stadl-Paura aygır deposundaki 6 Sıcak Kanlı (Warmblut) aygırın değişik süre ve ısıda çözülen donmuş spermallerinden ortalama olarak elde edilen başlıca spermatolojik özellikleri Tablo 1 de verilmiştir.

Tablodan da izlenebileceği gibi, bu aygırların çözüm sonu spermatozoon motilite oranı (%), ölü spermatozoon oranı (%) ve anormal spermatozoon oranları (%) sırasıyla, 1.30 saniye 40 °C de 26.40, 51.80 ve 40.88, 45 °C de 42.80, 37.80 ve 30.68, 50 °C de 41.00, 37.00 ve 34.68, 55 °C de 30.80, 42.28 ve 36.92; 2.35 saniye 40 °C de 25.60, 48.50 ve 32.86, 45 °C de 29.81, 41.50 ve 28.05, 50 °C de 45.00, 35.50 ve 23.88, 55 °C de 30.38, 39.80 ve 30.00; 3.40 saniye 40 °C de 30.20, 46.94 ve 42.18, 45 °C de 35.80, 39.92 ve 32.76, 50 °C de 49.60, 34.22 ve 25.52, 55 °C de 39.40, 36.00 ve 35.98 olmuştur.

### Tartışma ve Sonuç

Araştırmada kullanılan 6 Sıcak Kanlı aygırın donmuş spermalarının çözüm sonu spermatolojik özellikleri, çözme ısı ve süresine göre farklılık göstermektedir. Özellikle, spermatozoon motilite oranı ile anormal spermatozoon oranları birbirinden çok değişik bulunmuştur.

Bu farklılıklar, çözme ısı ve süresinin spermatozoonlar üzerine olan etkisinden kaynaklanmış olabilir.

Bu çalışmada, çözüm sonu en yüksek spermatozoon motilite oranı (% 49.60) ve en düşük ölü spermatozoon oranı (% 34.22) 40 saniye 50 °C de, en düşük anormal spermatozoon oranı (% 23.88) da, 35 saniye 50 °C de çözülen spermallerden elde edilmiştir.

Bu değerler, Aliev (1) in % 50; Bader ve Mahler (3) in % 50; Oliveira (14) nin % 45; Sevinç ve ark. (19) nin % 47.58 ve % 49.99,

Yurdaydın ve ark. (21) nin da, % 54.85, 46.50 ve 47.50 olarak elde ettikleri çözüm sonu motilite oranlarına benzerlik göstermektedir.

Çalışmada saptanan en düşük anormal spermatozoon oranı (% 23.88) ise, Yurdaydın ve ark. (21) nin % 26.80, 33.70 ve 45.50 olarak buldukları çözüm sonu anormal spermatozoon oranlarından düşüktür.

Söz konusu farklılık, araştırmada kullanılan aygırların değişik ırktan olmaları yanında, donmuş spermayı çözme ısı ve sürelerinde farklı olmasından ileri gelmiş olabilir.

Öteyandan, bu araştırmada elde edilen değerler, çözme ısı ve süresine göre kimi araştırmacıların (1, 3, 10, 13) değerlerinden düşük; kimi araştırmacıların (5, 8, 9) değerlerinden ise yüksektir.

Elde edilen bu sonuçların gerek kendi aralarında, gerekse literatür verileriyle yapılan karşılaştırmalarda farklı bulunması özellikle aygır spermasını dondurma teknik ve yöntemleriyle, donmuş spermayı çözme ısı ve süresinin de değişik olmasından ileri gelebileceği gibi, kullanılan aygırların farklı ve sperma sulandırıcılarında değişik olmasından olabilir.

Bu çalışma sonuçları, bir çok araştırmacısında (2, 5, 6, 7, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 22) belirttiği gibi, aygır spermasının başarıyla dondurulabileceğini göstermesi yanında, sun'i tohumlamada kullanılacak donmuş aygır spermasından normal bir dölverimi alabilmek için, tohumlama zamanının tesbitiyle birlikte, bu spermaların spermatolojik özelliklerinin en iyi olduğu çözme ısı ve süresinde çözülmesinin de çok önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

#### Kaynaklar

1. **Aliev, A.** (1975). *An improved technique of semen freezing*. Anim. Breed. Abstr., 44: 180.
2. **Bader, H.** (1970). *Weitere Erfahrungen über die Tiefgefrierung von Hengstsperma*. Zuchthygiene., 5: 87.
3. **Bader, H. und Mahler, R.** (1968). *Tiefgefrier - und Besamungsversuche mit Hengstsperma unter Anwendung des Pelletverfahrens*. Zuchthygiene., 3: 6-13.
4. **Banker, C.A. and Gandier, J.C.C.** (1957). *Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa*. Can. J. Comp. Med., 21: 47-51.
5. **Braun, J., Wolpert, E. und Leidl, W.** (1986). *Die Beschaffenheit von Hengstejalkulaten ausserhalb der Paarungssaison und deren Einfluss auf die TG-Konservierung*. Pferdeheilkunde., 2: 101-108.

6. **Busch, W., Löhle, K. und Peter, W.** (1983). *Künstliche Besamung bei Nutritieren*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena., DDR.
7. **Hess, R., Schäfer, W., Schmidt, D. und Baum, W.** (1968). *Versuche zur Pelletierung von Hengstsperma*. Fortplf. Bes. U. Aufz. der Haust., 4: 207-214
8. **Klug, E., Günzel, A.R., Merkt, H. Und Krause, D.** (1977a). *Untersuchungen von Hengsten von zum Einsatz in der instrumentellen Samenübertragung mit Tiefgefriersperma*. Dtsch. tierarztl. Wochenschr., 84: 236-238.
9. **Kozandağı, M. ve İşler, M.** (1981). *Türkiye'de aygır spermasının sıvı azotta dondurulması olanakları*. Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü Dergisi., Cilt XXI: 3-4
10. **Krause, D. und Grove, D.** (1967). *Deep freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form*. J. Reprod. Fertil., 14: 139-141.
11. **Martin, J.C. und Klug, E.** (1979). *Zur Samenübertragung beim Pferd-Spermakonservierung in Kunststoffröhrchen*. Prakt. Tierarzt., 3: 196-204.
12. **Merkt, H. und Krause, D.** (1966). *Tiefgefrierspermaundersuche mit Equidensperma unter Anwendung des sog. Pellet-Verfahrens*. Dtsch. tierarztl. Wochenschr., 73: 267-268.
13. **Nishikawa, Y., Waide, Y. and Shinomiya, S.** (1968). *Studies on deep freezing of horse spermatozoa*. VI. Internat. Kongr. Tier. Fortplf. Haustierbes., Paris II: 1589-1590.
14. **Oliveira, M.A.L.** (1982). *Einfluss verschiedener Aufbereitungsverfahren auf Motilität und Akrosinaktivität in der Thermoresistenzprüfung und auf das Befruchtungsergebnis von tiefgefrorenem Pferdesamen*. Hannover Tierarztl. Hochschule., Dissertation.
15. **Pitra, Ch., Schafer, W. und Jewgenow, K.** (1985). *Quantitative Bestimmung der Befruchtungsfähigkeit von tiefgefrorenem Hengstsperma mit dem Hamster - Oozytenpenetration Test*. Mh. - Vet. Med., 40: 235-237.
16. **Polge, C. and Minotakis, C.** (1964). *Deep freezing of jackass and stallion semen*. V. Internat. Kongr. Tier. Fortplf. Haustierbes., Trento I: 545-552.
17. **Roy, A.** (1955). *Storage of boar and stallion spermatozoa in glycine-egg-yolk Medium*. Vet. Rec., 67: 330.
18. **Schörner, G. und Leeb, M.** (1977). *Zur Tiefgefrierkonservierung von Hengstsamen*. Wien tierarztl. Monatsschr., 64: 91-93.
19. **Sevinç, A., Yurdaydın, N. ve Tekin, N.** (1984). *Karacabey Harası Safkan Arap ve Haflinger Aygırlarından alınan sermaların dondurulması ve Haflinger kısraklarından elde edilen dölvürimi*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 31 (2): 304-315.
20. **Szumowski, M.P.** (1954). *Essais de congelation du sperma de cheval*. Anim. Breed. Abstr., 23: 124.
21. **Yurdaydın, N., Sevinç, A. ve Wladar, W.** (1986). *Değişik ırktan aygırların spermalarının dondurulması üzerinde araştırmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 32 (3): 446-455.
22. **Zmurin, L.** (1959). *The Storage of stallion semen by freezing*. Anim. Breed. Abstr., 27 (1960): 282.