

DEĞİŞİK ANTİOKSİDANLAR İÇEREN FARKLI SULANDIRICILARLA DONDURULMUŞ KOÇ SPERMALARINDAN ELDE EDİLEN DÖLVERİMİ¹

Ongun UYSAL² Hüseyin KİNET³ Mesut ÇEVİK⁴ Serpil ÇETİNKAYA⁴

Fertility obtained from frozen ram semen with different extenders containing varied antioxidants

Summary: *The aim of this research was to evaluate the fertility relying on in vitro and in vivo findings, after freezing ejaculates of Akkaraman rams with different extenders and antioxidants.*

In experiment, totally 42 ejaculates collecting from rams per day by artificial vagina method were treated with regard to principle spermatological characteristics. Ejaculate volume averaged $1,04 \pm 0,04$ ml, sperm motility 76.55 ± 1.34 %, sperm concentration $2.60 \pm 0.11 \times 10^9$ /ml., the percentage of abnormal sperm 11.70 ± 2.60 %, the percentage of dead sperm 9.63 ± 0.93 % and sperm pH 6.75 ± 0.05 were established in fresh semen.

Sperm motility after thawing in frozen ram semen was averaged 48.30 ± 2.13 % by the Tris-1(vitamin C, glycerol, egg yolk), 54.33 ± 1.88 % by the Tris-2 (taurine, glycerol, egg yolk), 43.33 ± 1.88 % by the Tris-3(glycerol, egg yolk), 47.33 ± 2.02 % by the Hepes-1(vitamin C, glycerol, egg yolk), 62.83 ± 1.69 % by the Hepes-2(taurine, glyserol, egg yolk) and 44.33 ± 2.00 % by the Hepes-3(glycerol.

The percentage of abnormal sperm after thawing was averaged 20.03 ± 1.23 %, 17.77 ± 1.20 %, 25.50 ± 1.55 %, 19.60 ± 1.13 %, 15.83 ± 1.39 % and 21.83 ± 2.14 % for the same extenders respectively.

Similarly, the percentage of dead sperm was averaged 43.43 ± 1.98 %, 34.36 ± 1.83 %, 46.77 ± 2.02 %, 44.83 ± 2.01 %, 32.77 ± 1.73 % and 49.30 ± 2.14 % for the same extenders respectively.

In experiment, birth-rate was averaged 25.55 %, litter-size was averaged 1.2 and twinningrate was averaged 34.78 %.

Key words: Antioxidants, ram , reproduction, sheep, zwitterion buffers

Özet: *Çalışmada Akkaraman ırkı koç ejakulatlarının farklı sulandırıcı ve antioksidanlarla dondurulmasından sonra, in vitro ve in vivo bulgulara dayanarak dölveriminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.*

1. Bu araştırma AÜ Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 99-10-00-04).

2. Dr. AÜ Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i tohumlama Anabilim Dalı.

3. Dr. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü.

4. Araş. Gör. AÜ Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i tohumlama Anabilim Dalı

Araştırmada, koçlardan sun'i vajen yöntemiyle hergün alınan toplam 42 ejakulatta saptanan spermatozojik özelliklerden ejakulat miktarı $1,04 \pm 0,04$ ml, spermatozoa motilitesi % $76,55 \pm 1,34$, spermatozoa yoğunluğu $2,60 \pm 0,11 \times 10^9$ /ml, anormal spermatozoa oranı % $11,70 \pm 2,60$, ölü spermatozoa oranı % $9,63 \pm 0,93$ ve spermanın pH değeri $6,75 \pm 0,05$ olmuştur.

Dondurulmuş koç spermalarında çözüm sonu genel ortalama spermatozoa motilitesi Tris-1 ile % $48,30 \pm 2,13$, Tris-2 ile % $54,33 \pm 1,88$, Tris-3 ile % $43,33 \pm 1,88$ olurken, Hepes-1 ile % $47,33 \pm 2,02$, Hepes-2 ile % $62,83 \pm 1,69$ ve Hepes-3 ile % $44,33 \pm 2,0$ kaydedilmiştir.

Çözüm sonu genel ortalama anormal spermatozoa oranı aynı sulandırıcılar için sırasıyla % $20,03 \pm 1,23$, % $17,77 \pm 1,20$, % $25,50 \pm 1,55$, % $19,60 \pm 1,13$, % $15,83 \pm 1,39$ ve % $21,83 \pm 2,14$ saptanmıştır.

Benzer şekilde çözüm sonu ölü spermatozoa oranı da sırasıyla % $43,43 \pm 1,98$, % $34,36 \pm 1,83$, % $46,77 \pm 2,02$, % $44,83 \pm 2,01$, % $32,77 \pm 1,73$ ve % $49,30 \pm 2,14$ bulunmuştur.

Çalışmada genel ortalama doğum oranı %25,55, yavru oranı 1,2 ve ikizlik oranı ise %34,78 olmuştur.

Anahtar kelimeler: Antioksidanlar, koç, koyun, reproduksiyon, zwitterion bufferlar

Giriş

Koyunlarda 60 yıldan beri sun'i tohumlama çalışmaları yapılmakta olup, ilk uygulamalar Sovyetler Birliği'nde başlamış, sonra Avrupa ülkelerine geçmiştir.

Türkiye'de ise Cumhuriyet yıllarında başlatılan koyun ıslahı çalışmaları günümüzde amacına ulaşmaktan uzak kalmıştır. Türkiye 30 238 000 koyun varlığı ile hayvancılık sektörü içinde önemli bir yere sahipken, verim açısından aynı düzeyde olduğu söylenememektedir. Bunun çeşitli nedenleri olmakla birlikte, henüz koç spermasının başarıyla dondurulamaması ve dolayısıyla sığırlarda olduğu gibi rutin olarak dondurulmuş spermalarla sun'i tohumlamanın yapılamıyor olması da bu nedenler arasında yer alabilir(23).

Koyunlarda, taze sperma ile servikal ya da vaginal tohumlamalardan yüksek döl verimi sonuçları alınmasına rağmen, dondurulmuş sperma ile başarı oldukça düşüktür. Dondurulmuş sperma ile koyunlardan elde edilen fertilitenin yükseltilmesi için araştırmacılar uzun yıllar ça-

lışmışlar ve önce koyunlara ait nedenler üzerinde durmuşlardır(3). Bu amaçla laparoskopi yöntemiyle yapılan intrauterin tohumlama uygulamalarından oldukça iyi sonuçlar alınmış, ancak bu tohumlama yönteminin sayısı fazla koyun popülasyonları için pratik ve ucuz olmaması, zamandan tasarruf sağlamaması ve hatta embriyonik ölümlerin fazla görülmesi nedeniyle, uygulamada sıkıntı yaratmıştır (1). Bu nedenle araştırmacılar (6,25) son yıllarda koça ait faktörlere yönelerek, koç spermasını dondurma teknik ve yöntemleri üzerinde yoğunlaşmışlardır.

Koyun sonbaharda anöstrüstan çıkıp, 16 - 18 günlük periyodlar halinde mevsime bağlı poliostrus gösteren bir hayvan türüdür. Dolayısıyla koçların da reproduktif performansı çiftleşme mevsiminde en üst düzeyde olmaktadır (21).

Koç sperması kısa süreli (likid saklama) ya da uzun süreli (dondurularak) payet, pellet ve ampul biçiminde saklanabilmektedir (11). Koç spermasının dondurulmasında şimdilerde üzerinde en çok çalışılan konu sperma su-

landiricilari ve içerisinde katılan antioksidan maddelerdir. Bu konuda elde edilen sonuçlar umut vericidir. En azından günümüzdeki uygulamalara alternatif bir yaklaşımdır. Koç spermalarının sulandırılmasında bugüne kadar sakkaroz, glukoz, laktöz, rafinoz bulunduran sitrat, süt ve tris gibi sulandırıcılar kullanılmışsa da son yıllarda zwitterion bufferler denilen TES (N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid), HEPES (N-2 (hydroxyethyl) piperazine -n-2-ethane sulfonic acid) ve PIPES (piperazine -N,N-bis (2-ethane sulfonic acid) gibi Tris'ten daha iyi buffer kapasitesine sahip solusyonlar tercih edilmektedir (19).

Memeli hayvanların vücut sıvıları ve reproduktif dokularında da yüksek konsantrasyonlarda bulunan antioksidan maddeler, eksojen olarak sperma sulandırıcılarına katıldığında, spermadaki reaktif oksijen (O_2) türlerinin (superoxide, O_2 , hydroxyl radical OH ve hidrojen peroxide H_2O_2) neden olduğu, hücre membranındaki doymamış yağ asitleri ve fosfolipitlerin peroksidasyonunu minimuma indirmektedir. Böylece lipid peroksidasyonunun spermatozoa akrozomunda neden olduğu hasar azaltılabilmekte ve dolayısıyla elde edilen dölverimi önemli ölçüde yükseltilebilmektedir (4).

Koç spermalarını pellet biçiminde donduran Molinia ve ark. (13) TES, HEPES ve PIPES solusyonlarıyla en yüksek çözüm sonu spermatozoa özellikleri elde etmişler ve bu spermalarla yaptıkları intrauterin tohumlamalardan % 51.9 dölverimi almışlardır.

Kobayashi ve ark. (8) sperma sulandırıcılarına Superoxide dismutase katılmasının çözüm sonu spermatozoa motilitesindeki kaybı azalttığını, bunu da lipid peroksidasyonunu önleyerek sağladığını ifade etmişlerdir.

Farklı sulandırıcılarla Alman Etçi Merinos ırkı koç spermalarını donduran Tekin ve Günzel (22), Tris ve Test-M/OEP sulandırıcılarının spermatozoa motilitesini ve akrozom bü-

tünlüğünü daha iyi koruduğunu ortaya koymuşlardır.

Newes (14), Tris ile dondurduğu koç spermalarında, spermatozoonların in vitro yaşam süreleri ve morfolojilerini incelemiş ($37^\circ C$ 'de), çözüm sonu spermatozoa motilitesi ve akrozom bozukluğu oranını 4. saatte %10.9 ve %10.7 bulmuştur.

Dziuk ve ark. (4), TES solusyonuyla dondurdıkları koç spermalarından %13 dölverimi elde ederlerken, Graham ve ark. (7) %39-63 gibi başarılı bir sonuç almışlardır.

Merinos, Ramlıç ve Dağlıç ırkı koyunlarda östrus sinkronizasyonu yapan Tekin ve ark. (21) taze spermalarla yaptıkları servikal tohumlamalardan en yüksek gebelik oranını %68.0 elde ederlerken, Tris ile dondurulmuş spermalarla %39.3 dölverimi almışlardır.

Bu çalışmada, in vivo ve in vitro bulgulara dayanarak, koç spermalarının dondurulmasında farklı sperma sulandırıcıları ve antioksidan maddelerin etkinliği araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

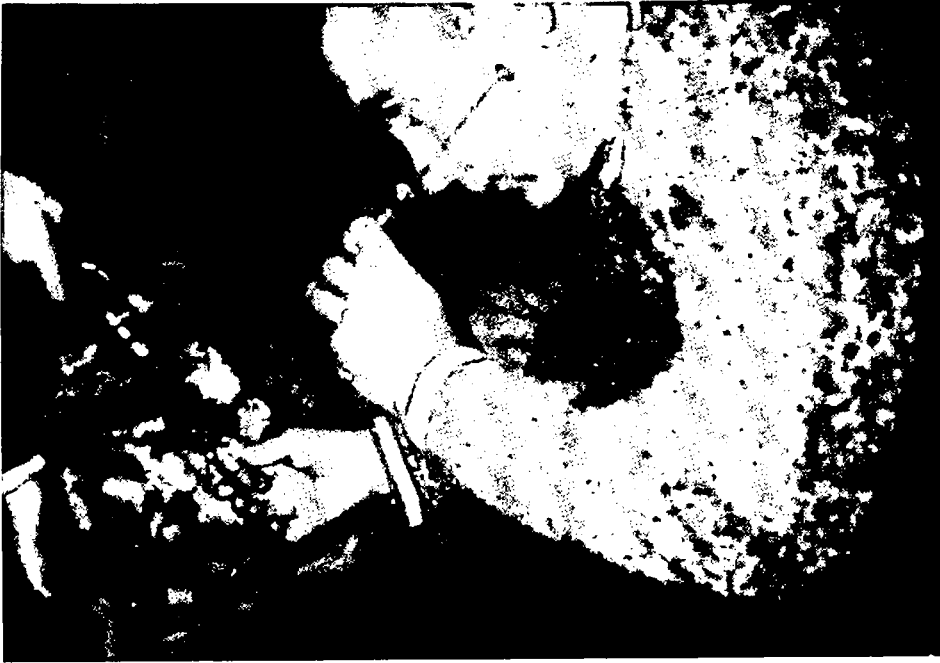
Çalışmada Akkaraman ırkı 3 koçun spermaları kullanılmıştır. Araştırmanın başlangıcında koçlar 1 hafta süreyle sperma vermeye alıştırmıştır. Araştırma süresince spermalar sun'i vajen (Resim 1) yöntemiyle her gün alınmış ve elde edilen ejakülatlar sperma alma yerinde hazırlanan laboratuvarında başlıca spermatozoa özellikleri yönüyle incelenmiştir.

Spermaların dondurulması için TRIS ve HEPES solusyonları olmak üzere iki ayrı sperma sulandırıcısı ve vitamin C ile taurin antioksidanları (Sigma) kullanılmıştır. Sulandırıcıların pH'sı NaOH ile 7.0'a ayarlanmıştır.

TRIS-1	= 10 mM Vitamin C + %3 Glycerol + %3 Yumurta sarısı + Tris
TRIS-2	= 50 mM Taurine + %3 Glycerol + %3 Yumurta sarısı + Tris
TRIS-3 (Kontrol)	= %3 Glycerol + %3 Yumurta sarısı + Tris
HEPES-1	= 10 mM Vitamin C + %3 Glycerol + %3 Yumurta sarısı + HEPES



Resim 1. Akkaraman koçtan sun'i vajen yöntemiyle sperma alınması.
Figure 1. Semen collecting from Akkaraman rams with artificial vagina method.



Resim 2. Akkaraman koyunda servikal yöntemle sun'i tohumlama.
Figure 2. Artificial insemination with cervical method in Akkaraman shecp.

HEPES-2 = 50 mM Taurine + %3 Glycerol +
%3 Yumurta sarısı + Hapes
HEPES-3 (Kontrol) = %3 Glycerol + %3 Yumurta sarısı
+ Hapes
olmak üzere toplam 6 sulandırıcı hazırlanmıştır.

Ejakulatlar 6 eşit kısma bölünerek ,bu so-
lasyonlarla bir tohumlama dozunda (0.25ml)
200x10⁶ motil spermatozoa bulunacak şekilde
dozlanmıştır.Sulandırılan spermalar payetlere

çekildikten sonra +4°C'de 2.5 saat ekilibrasyona (alışım) bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda spermalar ısıyı 5 dakikada -142°C'a düşüren digital dondurma cihazında (Digitcool 5300 2B 250) dondurulmuş ve -196°C'da sıvı azotta saklanmıştır.

Dondurulmuş spermalarından 38°C da 15 sn. de her sulandırıcı için 10, her koç için 60 olmak üzere toplam 180 payet çözülmüş ve 540 numunede çözüm sonu spermatolojik özelliklerinden spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı saptanmıştır.

Dondurulmuş koç spermalarının, in vitro yaşam süreleri ve akrozom yapıları 4 saat süreyle incelenmiştir. Bu amaçla her sulandırıcı için 10, her koç için 60 olmak üzere 38°C da 15 sn. de toplam 180 payet çözülerek 38°C lik su banyosunda inkübe edilmiştir. Çözümünden sonra toplam 360 numunede 0., 2., ve 4. saatlerde spermatozoa motilitesi ve akrozom bozuklukları kaydedilmiştir.

Morfolojik muayeneler için bir damla sperma 0.5 ml Hancock solusyonunda fikse edilmiş, bu karışımdan alınan numune mikroskobun immersiyon bakısında (x100) sedir yağı damlatılarak incelenmiştir.

Koyunların tohumlanması

Arama koçlarıyla östrusta oldukları belirlenen koyunlar ilk östruslarında bir tohumlama dozunda 200×10^6 /ml motil spermatozoa bulunacak şekilde dozlanarak dondurulmuş spermalarla servikal yöntemle (Resim2) tohumlanmıştır. Bir koçun spermalarıyla her sulandırıcı için 5 olmak üzere toplam 6 sulandırıcı için 30 koyun tohumlanmış, toplam 3 koç için ise 90 koyuna sun'i tohumlama yapılmıştır.

Tohumlanan koyunlar gebelikleri süresince izlenmiş, doğum oranı, yavru oranı ve ikizlilik oranları kaydedilmiştir.

Bulgular

Araştırmada kullanılan 3 Akkaraman ırkı koçun toplam 42 ejakulatında saptanan spermatolojik özelliklerin genel ortalama değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre genel ortalama ejakulat miktarı 1.04 ± 0.04 ml, spermatozoa motilitesi 76.55 ± 1.34 , spermatozoa yoğunluğu $2.60 \pm 0.11 \times 10^9$ /ml, anormal spermatozoa oranı 11.70 ± 2.60 , ölü sp. oranı 9.63 ± 0.93 ve spermanın pH değeri 6.75 ± 0.05 bulunmuştur.

Dondurulmuş koç spermalarında çözüm sonu genel ortalama spermatozoa motilitesi Tris-1 ile 48.30 ± 2.13 , Tris-2 ile 54.33 ± 1.88 , Tris-3 ile 43.33 ± 1.88 olurken, Hepes-1 ile 47.33 ± 2.02 , Hepes-2 ile 62.83 ± 1.69 , Hepes-3 ile 44.33 ± 2.00 kaydedilmiştir (Tablo 2 ve 5).

Çözüm sonu genel ortalama anormal spermatozoa oranı aynı sulandırıcılar için sırasıyla 20.03 ± 1.23 , 17.77 ± 1.20 , 25.50 ± 1.55 , 19.60 ± 1.13 , 15.83 ± 1.39 ve 21.83 ± 2.14 saptanmıştır (Tablo 3 ve 5).

Benzer şekilde çözüm sonu ölü spermatozoa oranı da sırasıyla 43.43 ± 1.98 , 34.36 ± 1.83 , 46.77 ± 2.02 , 44.83 ± 2.01 , 32.77 ± 1.73 ve 49.3 ± 2.14 bulunmuştur (Tablo 4 ve 5).

Dondurulmuş koç spermalarına uygulanan termorezistens test sonuçlarına bakıldığında 4. Saat sonunda 01-61 nolu koçta spermatozoa motiliteleri sırasıyla Tris-1 ile 15.00 ± 5.00 , Tris-2 ile 16.30 ± 3.33 , Tris-3 ile 4.00 ± 1.25 , Hepes-1 ile 15.50 ± 1.86 , Hepes-2 ile 28.00 ± 4.46 ve Hepes-3 ile 13.00 ± 4.23 bulunurken, 157/8 nolu koçta sırasıyla 14.00 ± 3.23 , 19.00 ± 4.27 , 6.50 ± 1.63 , 17.50 ± 1.45 , 21.00 ± 3.40 ve 9.50 ± 3.43 , T-64 nolu koçta ise 11.00 ± 2.67 , 15.00 ± 3.02 , 12.00 ± 3.18 , 11.00 ± 3.14 , 27.50 ± 2.98 , 16.50 ± 2.80 saptanmıştır (Tablo 6).

01-61, 157/8 ve T-64 nolu koçların dondurulmuş spermalarıyla elde edilen ortalama doğum oranları Tris-1 ile % 6.66, Tris-2 ile %33.33, Tris-3 ile %13.33, Hepes-1 ile %6.66, Hepes-2 ile %66.66 ve Hepes-3 ile %26.66 saptanırken, ortalama yavru oranı aynı sulandırıcılar için sırasıyla 1.0, 1.4, 1.5, 1.0, 1.5 ve 1.0 olmuştur. Tohumlanan toplam 90 koyunda genel ortalama doğum oranı % 25.55,

ortalama doğum oranı 1.2 ve ikizlilik oranı ise %34.78 (23 koyundan 8 tanesi ikiz doğurmuştur) kaydedilmiştir (Tablo 7).

Bu araştırmanın istatistik çalışmalarında ikili karşılaştırmalarda T-testi, ikiden fazla karşılaştırmalarda Varyans Analizi Tekniği kullanılmıştır(20).

Tablo 1. Akkaraman ırkı koçlarda saptanan başlıca spermatozojik özelliklerin ortalamaları
Table 1. The averages of the principle spermatozoological values which was determined in Akkaraman rams

Koç No	Ejakülat Miktarı (ml) $\bar{x} \pm s_x$	Spermatozoa Motilitesi (%) $\bar{x} \pm s_x$	Spermatozoa Yoğunluğu ($\times 10^9/ml$) $\bar{X} \pm s_x$	Anormal Spermatozoa Oranı (%) $\bar{x} \pm s_x$	Ölü Spermatozoa Oranı (%) $\bar{x} \pm s_x$	pH $\bar{x} \pm s_x$	n
01-61	1.1 \pm 0.06	77.86 \pm 2.60 ab	2.49 \pm 0.12	14.36 \pm 4.61	10.53 \pm 2.19	6.61 \pm 0.05 a	14
157/8	0.98 \pm 0.03	71.78 \pm 1.78 a	2.80 \pm 0.22	8.68 \pm 2.11	10.68 \pm 1.42	6.71 \pm 0.11 ab	14
T-64	1.16 \pm 0.10	80.00 \pm 2.11 b	2.50 \pm 0.20	12.16 \pm 3.62	7.68 \pm 3.62	6.93 \pm 0.07 b	14
Genel Ortalama	1.04 \pm 0.04	76.55 \pm 1.34	2.60 \pm 0.11	11.70 \pm 2.60	9.63 \pm 0.93	6.75 \pm 0.05	Toplam
F	- 1.967	* 3.789	- 0.918	0.630	- 1.108	* 3.774	42

- a,b,ab : P<0.05 Aynı sütunda ortak harf taşımayan grup ortalamaları arası fark önemli
• : P<0.05 Grup ortalamaları arası fark önemli
- : P>0.05 Grup ortalamaları arası fark önemsiz

Tablo 2. Dondurulmuş koç spermalarında çözüm sonu spermatozoa motilitesi ortalamaları (%)
Table 2. The averages of post-thawing sperm motility in frozen ram semen (%)

Sulandırıcı Koç no	Tris-1 $\bar{x} \pm s_x$	Tris-2 $\bar{x} \pm s_x$	Tris-3 $\bar{x} \pm s_x$	Hepes-1 $\bar{x} \pm s_x$	Hepes-2 $\bar{x} \pm s_x$	Hepes-3 $\bar{X} \pm s_x$	n	Toplam	
01-61	49.00 \pm 2.77	53.50 \pm 3.74	43.00 \pm 3.40	49.00 \pm 3.14	63.00 \pm 3.27	44.00 \pm 4.23	10	60	180
157/8	46.40 \pm 5.46	54.00 \pm 3.78	42.00 \pm 2.60	46.00 \pm 1.63	60.00 \pm 3.27	43.00 \pm 3.18	10	60	
T-64	49.50 \pm 2.41	55.50 \pm 2.36	45.00 \pm 3.39	47.00 \pm 4.82	65.50 \pm 2.33	46.00 \pm 3.14	10	60	
Genel Ortalama	48.30 \pm 2.13	54.33 \pm 1.88	43.33 \pm 1.88	47.33 \pm 2.02	62.83 \pm 1.69	44.33 \pm 2.00			
F	- 0.192	- 0.052	- 1.249	- 1.370	- 0.485	- 0.343			

- : (P>0.05) Grup ortalamaları arası fark önemsiz

Tablo 3. Dondurulmuş koç spermalarında çözüm sonu anormal spermatozoa oranı ortalamaları (%)
Table 3. The averages of post-thawing abnormal sperm motility in frozen ram semen (%)

Sulandırıcı Koç no	Tris-1 x ± sx	Tris-2 x ± sx	Tris-3 x ± sx	Hepes-1 x ± sx	Hepes-2 x ± sx	Hepes-3 X ± sx	n	Toplam	
01-61	22.20±1.99	16.50±1.34 a	24.60±2.39	19.30±2.20	19.80±2.64 b	19.70±3.37 b	10	60	180
157/8	19.90±2.50	22.20±2.34 b	32.60±1.89	23.90±1.81	17.20±2.37 b	26.50±2.85 b	10	60	
T-64	18.00±2.54	14.60±1.81 a	19.30±3.20	14.00±1.53	10.50±0.96 a	15.20±2.80 a	10	60	
Genel Ortalama	20.03±1.23	17.77±1.20	25.50±1.55	19.60±1.13	15.83±1.39	21.83±2.14			
F	- 0.275	* 4.453	- 2.514	- 2.457	* 2.457	** 8.324			

a.b : (P<0.05) Aynı sütunda ortak harfl taşımayan grup ortalamaları arası fark önemli

• : (P<0.05) Grup ortalamaları arası fark önemli

** : (P<0.01) Grup ortalamaları arası fark önemli

- : (P>0.05) Grup ortalamaları arası fark önemsiz

Tablo 4. Dondurulmuş koç spermalarında çözüm sonu ölü spermatozoa oranı ortalamaları (%)
Table 4. The averages of post-thawing dead sperm motility in frozen ram semen (%)

Sulandırıcı Koç no	Tris-1 X ± sx	Tris-2 x ± sx	Tris-3 x ± sx	Hepes-1 x ± sx	Hepes-2 x ± sx	Hepes-3 x ± sx	n	Toplam	
01-61	46.70±2.68 a	32.00±2.69	48.60±2.98	40.20±1.70 a	25.40±2.05 a	50.00±3.09	10	60	180
157/8	42.60±3.58 b	40.20±2.48	47.90±2.38	51.40±3.73 b	32.70±2.87 b	51.60±5.32	10	60	
T-64	41.00±2.39 b	30.90±3.86	43.80±4.85	42.90±3.27 a	40.20±2.05 c	46.30±2.18	10	60	
Genel Ort.	43.43±1.98	34.36±1.83	46.77±2.02	44.83±2.01	32.77±1.73	49.30±2.14			
F	** 6.351	- 1.956	- 0.528	** 5.677	*** 9.857	- 0.520			

a.b.c : (P<0.05) Aynı sütunda ortak harfl taşımayan grup ortalamaları arası fark önemli

* : (P<0.05) Grup ortalamaları arası fark önemli

** : (P<0.01) Grup ortalamaları arası fark önemli

*** : (P<0.001) Grup ortalamaları arası fark önemli

- : (P>0.05) Grup ortalamaları arası fark önemsiz

Tablo 5. Dondurulmuş koç spermalarında çözüm sonu spermatolojik özelliklerin genel ortalamaları (%)
 Table 5. The general averages of post-thawing spermatological values in frozen ram semen (%)

Sulandırıcı	Tris-1 x ± sx	Tris-2 x ± sx	Tris-3 x ± sx	F	Hepes-1 x ± sx	T	Hepes-2 x ± sx	T	Hepes-3 x ± sx	T	F	n	Toplam
Spermatozoa Motilitesi (%)	48.30±2.13	54.33±1.88	43.33±1.88	- 2.822	47.33±2.02 a	- 1.021	62.83±1.69 b	- 0.114	44.33±2.00 a	- 0.563	*** 8.667	180	540
Anormal Spermatozoa Oranı (%)	20.03±1.23	17.77±1.20	25.50±1.55	- 3.812	19.60±1.13 a	- 0.814	15.83±1.39 b	- 1.712	21.83±2.14 c	- 1.355	*** 8.940	180	
Ölü Spermatozoa Oranı (%)	43.43±1.98 b	34.36±1.83 a	46.77±2.02 b	*** 2.898	44.83±2.01 b	- 0.123	32.77±1.73 a	- 1.210	49.30±2.14 c	- 0.831	*** 18.932	180	

a,b,c : (P<0.05) Aynı satırda ortak harf taşımayan grup ortalamaları arası fark önemli
 *** : (P<0.001) Grup ortalamaları arası fark önemli
 - : (P>0.05) Grup ortalamaları arası fark önemsiz

Tablo 6. Dondurulmuş koç spermalarına uygulanan termorezistens test sonuçlarının genel ortalamaları(%)
 Table 6. The general averages of thermorezistence test results applying on frozen ram semen (%)

Spermatolojik Özellikler	Sulan dırı Saat	Tris-1 x ± sx	Tris-2 x ± sx	Tris-3 x ± sx	F	Hepes-1 x ± sx	T	Hepes-2 x ± sx	T	Hepes-3 x ± sx	T	F	n	Toplam	
	0.	48.30±2.13	54.33±1.88	43.33±1.88	- 0.640	47.33±2.02 c	- 1.648	62.83±1.69 b	- 0.663	44.33±2.00 a	- 0.849	*** 8.667	180	360	
Spermatozoa Motilitesi	2.	29.67±1.89 a ○	33.83±1.85 b	26.66±1.94 c ○	** 5.638	25.00±2.04 b ○	* 2.339	36.43±1.70 a	- 0.728	32.13±2.38 a ○	* 2.385	** 6.214			
(%)	4.	13.30±2.12 a ○	16.76±2.24 a	7.50±1.36 b ○○	** 5.839	14.66±1.32 b ○	* 2.066	25.50±1.70 a	- 0.953	13.00±1.87 b ○○	** 3.171	** 5.884			
	0.	15.56±1.14	14.10±1.48	19.16±1.33	- 1.135	14.87±1.23 ab	- 0.718	12.80±1.25 a	- 1.170	19.27±1.47 b	- 0.742	** 6.739	180		360
Bozuk Akrozom	2.	32.80±2.14	29.40±2.21 ○	38.10±2.34	- 0.918	28.47±2.04 a	- 1.014	24.23±1.80 b ○	* 2.280	32.27±2.19 a	- 1.820	*** 9.837			
Oranı (%)	4.	44.73±2.73	42.83±2.47	54.30±2.46 ○	- 0.670	38.76±2.01 a	- 0.285	37.37±1.84 a	- 1.774	48.70±2.15 b ○	* 2.134	*** 10.211			

- a,b,c : (P<0.05) Aynı satırda ortak harf taşımayan grup ortalamaları arası fark önemli
 * : (P<0.05) Grup ortalamaları arası fark önemli
 ** : (P<0.01) Grup ortalamaları arası fark önemli
 *** : (P<0.001) Grup ortalamaları arası fark önemli
 - : (P>0.05) Grup ortalamaları arası fark önemsiz
 ○,○○ : (P<0.05) Aynı satırda farklı simgeleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli

Tablo 7. Akkaraman ırkı koyunlarda dondurulmuş koç spermalarıyla elde edilen doğum- yavru oranları(%)
Table 7. The birth rate- litter size which was obtained from frozen ram semen in Akkaraman sheep(%)

	Koç no	Tris-1	Tris-2	Tris-3	Hepes-1	Hepes-2	Hepes-3	n	Toplam	Genel Ortalama
Doğum sayısı	01-61	1	3	1	1	4	1	5	30	
	157/8	-	-	-	-	2	1	5	30	
	T-64	-	2	1	-	4	2	5	30	
Toplam		1	5	2	1	10	4	15	90	
Ortalama doğum oranı	6.66	33.33	13.33	6.66	66.66	26.66				25.55
Yavru sayısı	01-61	1	5	2	1	7	1	5	30	
	157/8	-	-	-	-	2	1	5	30	
	T-64	-	2	1	-	6	2	5	30	
Toplam		1	7	3	1	15	4	15	90	
Ortalama yavru oranı		1.0	1.4	1.5	1.0	1.5	1.0			1.2

Tartışma ve Sonuç

Bu araştırmada saptanan başlıca spermatojik özelliklere ilişkin değerler büyük ölçüde fizyolojik sınırlar içinde kalmıştır. Ortalama spermatojik değerlerdeki farklılıklar araştırmacıların değişik ırk ve genetik yapılarıdaki koçlarda çalışmalarından kaynaklanabildiği gibi, bireysel faktörler, farklı sperma alma ve değerlendirme tekniklerinden ve değişik dondurma yöntemlerinden de ileri gelebilir (4).

Nitekim bu çalışmada istatistiksel açıdan bireylerarası farklılıklar ejakülat miktarı, spermatozoa yoğunluğu, anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı yönüyle önemsiz ($P>0.05$) bulunurken, spermatozoa motilitesi ve pH yönüyle önemli ($P<0.05$) kaydedilmiştir (Tablo 1).

Koç spermasının dondurulmasında bugüne kadar değişik sulandırıcılar denenmişse de henüz arzu edilen başarıya ulaşılamamıştır. Ancak son yıllarda TES, HEPES VE PIPES gibi zwitterion bufferlarla yapılan çalışmalardan olumlu sonuçlar alınmaktadır (13).Sulandırıcılara glyserol ve yumurta sarısı gibi kryoprotektanların katılması bile, koç spermasının dondurulmasında, çözüm sonu spermatozoa motilitesinin ve fertilitenin düşmesi ya da plazma membranlarındaki hasarı önleyememektedir (6, 8, 14).

Sunulan çalışmada da Tablo-2'e bakıldığında yalnızca kryoprotektan ve yumurta sarısı bulunduran kontrol gruplarında spermatozoa motilitesinin antioksidan katılmış sulandırıcılardan daha düşük olduğu görülmektedir. Çözüm sonu anormal spermatozoa ve ölü spermatozoa oranı da yine aynı şekilde diğer sulandırıcılardan daha yüksek bulunmuştur (Tablo 3 ve 4). Yine benzer şekilde Hepes-3 ile elde edilen sonuçlar Tris-3'den daha başarılı olmuştur. Ancak istatistik çalışmalar gözlenen bu farklılıkların önemli olmadığını ($P>0.05$) ortaya koymuştur.

Son yıllarda doğal olarak seminal plazmada da yüksek konsantrasyonlarda bulunan taurin, hypotaurin, inositol, prolin, SOD, catalase, BHT, desferal, ascorbic acid, alpha-tocopherol gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir. Bu amaçla birçok araştırmacı (15) sperma sulandırıcılarına bu antioksidan maddelerden katarak dondurdukları koç spermalarında çözüm sonu spermatozoa motilitesinin yükseldiğini, akrozom bozukluklarının azaldığını göstermişlerdir.

Vitamin E (alpha -tocopherol) membran yapısını destabilize etmekte ve sitotoksik oksidasyon ürünlerinin oluşumunu engellemektedir. İnositol,antioksidan özelliğiyle

dondurulmuş koç spermasında spermatozoonların akrozom bütünlüğünü korumaktadır. Carnosin biyolojik membranların lipid komponentlerinden derive edilen oksidasyon ürünlerini elimine ederken, askorbik asit (vitamin C) koç seminal plazmasında da bulunmakta ve serbest radikallerin neden olduğu hasarlardan spermatozoonları korumaktadır. Prolin, dondurma sırasında hücrelerdeki dehidrasyon ve sulandırıcıdaki hiperozmolaritenin neden olduğu denaturasyona karşı spermatozoonları koruyan non -toksik intrasellüler bir madde olarak rol oynamaktadır (2, 8).

Shanchez-Partida ve ark (17) farklı antioksidanlar katarak dondurdukları koç spermalarında çözüm sonu spermatozoa motilitesini, 50 mM taurin katılmış % 3-5 glyserol bulunduran Tris sulandırıcısıyla %60'ın üzerinde bulduklarını söylemişlerdir.

Sulandırıcıda antioksidanların kullanılması, yumurta sarısı, DMSO ve glyserol gibi kryoprotektanların daha düşük konsantrasyonlarda kullanılmasını sağlamaktadır (12). Watson ve Martin (24) glyserolün çözüm sonu akrozom bozukluklarını artırdığını, Lightfoot ve Salamon (10) serviks içine spermatozoa taşınmasını olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Antioksidan maddelerin aynı zamanda kryoprotektan da olması, bu maddelerle dondurulan spermallerden daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamaktadır.

Sunulan çalışmada, Taurine bulunduran Tris ve Hepes sulandırıcılarıyla dondurulmuş spermallerden elde edilen çözüm sonu spermatozoa motilitelerini Vitamin C katılmış olanlara göre daha yüksek, anormal spermatozoa ve ölü spermatozoa oranlarının daha düşük olduğu saptanmıştır (Tablo2,3,4).

Toplam 540 numunede değerlendirilen genel ortalama spermatozoa oranlarına bakıldığında (Tablo 5) çözüm sonu en yüksek spermatozoa motilitesi Tris ve Hepes ile sırasıyla (%54.33±1.88 ve %62.83±1.69), en düşük anormal spermatozoa oranı

(%17.77±1.20 ve %15.83±1.39) ve en düşük ölü spermatozoa oranı (%34.36±1.83 ve %32.77±1.73) taurine içeren sulandırıcılarla gerçekleşmiştir.

İstatistik açıdan genel ortalama spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı yönüyle Tris sulandırıcısının kendi içinde antioksidanlar arasında gözlenen farklılıklar önemsiz ($P>0.05$) bulunurken, Hepes sulandırıcısına katılan antioksidanlar arasındaki ayrılıklar önemli kaydedilmiştir ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$).

Çözüm sonu .spermatolojik özelliklere bireysel faktörlerin de etkisi olmuş, istatistik açıdan çözüm sonu anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı yönüyle koçlar arasında önemli farklılıklar gözlenirken ($P>0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), spermatozoa motilitesi bakımından farklılıklar önemli bulunmamıştır ($P>0.05$).

Dondurulmuş koç spermalarının in vitro (380C'de) yaşam süreleri ve morfolojik yapıları, kullanılan sulandırıcı ve kryoprotektan hatta antioksidan oranıyla yakından ilgilidir (14).

Pontbriand ve ark. (16), koç spermalarını TEST sulandırıcısıyla pellet ve payet biçiminde dondurmuşlar, çözüm sonu 20°C'de 6 saat sonunda spermatozoa motilitesinin %22.9'a düştüğünü, akrozom bozukluklarının %18'e yükseldiğini söylemişlerdir.

Alman Etçi Merinos ırkı koç spermalarını donduran Tekin ve Günzel (22) 38°C'de çözüm sonu spermalara uyguladıkları termorezistens test sonunda (4.saatte) en yüksek spermatozoa motilitesini ve normal akrozom oranını sırasıyla Tris ile %27.2 ve %55.3, Test-M / OEP ile %33.5 ve %62.2 saptamışlardır.

Bu çalışmada toplam 360 numunede, dondurulmuş koç spermalarına uygulanan termorezistens test sonuçlarına bakıldığında 4.saat sonunda gözlenen değerlerin, çözüm sonu (0.saat) değerlerine bağlı olduğu görüldüğü gibi, sulandırıcıların ve antioksidanların sper-

matolojik özellikler üzerindeki etkileri farklı olmuş, antioksidan katılmış sulandırıcılarla dondurulmuş spermalarda kontrol gruplarına göre daha başarılı sonuçlar alınmış ve 4. saatte en yüksek spermatozoa motilitesi (%25.50±1.70) ve en düşük bozuk akrozom oranı (%37.37±1.84) Heps+Taurinle gerçekleşmiştir (Tablo 6).

Sulandırıcılar arasında istatistik açıdan spermatozoa motilitesi yönüyle gözlenen farklılıklar 2. ve 4. saatlerde Tris-1 ve Heps-1, Tris-3 ve Heps-3 arasında önemli ($P<0.05$, $P<0.01$) saptanırken, bozuk akrozom oranı yönüyle 2. saatte Tris-2 ve Heps-2, 4. saatte Tris-3 ve Heps-3 arasında da önemli ($P<0.05$) kaydedilmiştir. Antioksidanlar arasında gözlenen farklılıklar ise Tris sulandırıcısı için spermatozoa motilitesi yönüyle 2. ve 4. saatte önemli ($P<0.01$) olurken, Heps için spermatozoa motilitesi ve bozuk akrozom oranı yönüyle 0., 2. ve 4. saatlerde önemli ($P<0.01$, $P<0.001$) bulunmuştur (Tablo 6).

Ayrıca termorezistens test uygulamalarında elde edilen sonuçlara bireysel faktörlerin de etkisi olmuş, dolayısıyla koçların sulandırıcılara cevabı ayrı olurken istatistik açıdan gözlenen farklılıklar önemli ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$) bulunmuştur (Tablo 6 ve 7).

Koyunlarda taze sperma ile vaginal ya da servikal tohumlamalar yapıldığında başarılı gebelik oranları elde edilmesine rağmen, dondurulmuş sperma için en ideal yöntem intrauterin tohumlamadır. Koyunlarda serviksin tırbüşon benzeri, sirküler yapısından dolayı, kateterle geçip uterusu ulaşmak mümkün olmamaktadır (9).

Dondurulmuş spermalarla servikal tohumlamalardan elde edilen gebelik oranları %10-45 arasında kalmaktadır (5). Ancak son yıllarda farklı sulandırıcı ve antioksidanlar kullanılarak dondurulmuş spermalardan umut verici sonuçlar alınmaktadır. Dziuk ve ark. (4) TES solusyonuyla dondurdukları koç spermalarıyla yaptıkları tohumlamalardan %13 oranında gebelik elde ettiklerini bil-

dirirlerken, Graham ve ark. (7) ise %39-63 gibi oldukça yüksek sayılabilecek bir dölverimi almışlardır.

Sanchez-Partida ve ark. (18) proline veya glycine-betaine bulunduran Heps sulandırıcısıyla elde edilen çözüm sonu spermatozoa motilitesinin Tris'e göre daha iyi olduğunu, ancak fertilitenin Heps ile %66.6, Trisle %71.1 olduğunu ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada dondurulmuş koç spermalarıyla elde edilen dölverimi koyunlardaki doğum oranı, yavru oranı ve ikizlik oranıyla değerlendirilmiştir. Tablo 7'den de izleneceği gibi en yüksek doğum oranı (%66.66) Heps-2 sulandırıcısıyla elde edilmiş ve en düşük doğum oranı (%6.66) ise kontrol gruplarında olmuştur.

Genel ortalama doğum oranı (%25.55), yavru oranı (1.2) ve ikizlik oranı (%34.78) beklenen düzeyde gerçekleşmiş, dondurulmuş spermalarla servikal tohumlamaların yeterince başarılı olmamasından dolayı daha yüksek dölverimi elde edilememiştir (5, 20). Dolayısıyla bu araştırmanın devamı şeklinde bir başka çalışmanın, dondurulmuş spermalar için en uygun yöntem olan intrauterin tohumlama ile desteklenmesi durumunda daha yüksek dölverimi alınacağı kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile in vitro ve in vivo bulgulara dayanarak Heps sulandırıcısının Tris'e, bir antioksidan olarak Taurinin de Vitamin C'ye üstün olduğu saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Ayar A, Akdeniz C (1995) Ankara keçilerinde dondurulmuş sperma kullanılarak intrauterin ve intraservikal tohumlama uygulamaları. Lalahan Hay Arş Ens Der, 35, 79-86.
2. Carpenter JF, Hand SC, Crowe LM, Crowe JH (1986) Cryoprotection of phosphofructokinase with organic solutes: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cation. Arch. Biochem. Biophys, 250: 505-512.
3. Colan G, Courot M (1977) Production of spermatozoa, storage of semen and artificial insemination in the sheep. Proc. Symp. Management of Reproduction in Sheep and Goats. University of Wisconsin, Madison, p. 31-40.

4. Dziuk PT, Lewis JM, Graham EF, Moyer R H (1972) *Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen sperm at an appointed time in the ewe.* J Anim Sci **35**, 572-575.
5. Evans G (1988) *Current topics in artificial insemination of sheep.* Aust J Biol Sci. **41**:103-106.
6. Fitzgerald JA, Stellflug JN (1991) *Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams.* J Anim Sci, **69**, 264-275.
7. Graham EF, Crabo BG, Pace MM (1978) *Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion.* J Anim Sci, **47**, 80-119.
8. Kobayashi T, Miyasaki T, Natori M, Nozawa S (1991) *Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxidase in human seminal plasma and spermatozoa.* Hum Reprod., **6**, 987-991.
9. Kristinsson G, Wissdorf H (1985) *Structure of the cervix uteri and course of the cervical canal of the uterus in sheep.* Tierarztl Prax., **13**, 299-305.
10. Lightfoot LA, Salamon S (1970) *Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe.* J Reprod Fertil, **22**, 385-398.
11. Maxwell WMC, Salamon S (1993) *Liquid storage of ram semen.* Reprod Fertil Dev, **5**, 613-638.
12. Milovanov VK, Sokolovskaya II (1980) *Long-term storage of ram semen and new possibilities of large scale selection in sheep breeding.* Vestnik Selskok Nauki, **12**, 122-132.
13. Molina FC, Evam G, Maxwell WM (1996) *Fertility of ram spermatozoa pellet-frozen in zwitterion-buffered diluents.* Reprod Nutr Dev, **36**, 21-29.
14. Neues JP (1980) *Untersuchungen zur Samenübertragung beim Schaf unter besonderer Berücksichtigung der Spermatiefgefrierkonservierung.* Hannover Tierarztl Hochschule Diss.
15. Pomares CC, Stojanov T, Eppleton J, Maxwell WMC (1994) *Effect of glutathion peroxidase on the survival of the goat and ram spermatozoa during liquid storage.* Proc 7 th. Int Symp Spermatol Abstr, **9**, 24.
16. Pontbriand D, Howard JG, Schiewe MC, Stuart LD, Wildt DE (1989) *Effect of cryoprotective diluent and method of freeze - thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa.* Cryobiology, **26**, 341-354.
17. Sanchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell MC (1997) *Epidimal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa.* Reprod Fertil Dev, **9**, 689-696.
18. Sanchez-Partida LG, Windsor DP, Eppleston J, Setchell BP, Maxwell WM (1999) *Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical and intrauterine insemination with frozen- thawed ram semen.* J Androl, **20**, 280-288.
19. Shannon P, Curson B (1982): *Kinetics of the aromatic L-amino acid oxidase from dead bovine spermatozoa and the effect of catalase on fertility of diluted bovine semen stored at 5°C and ambient temperatures.* J Reprod Fertil, **64**, 463-467.
20. Sümbüllüoğlu K, Sümbüllüoğlu V (1993) *Biyoistatistik.* 4. Baskı, Özdemir yayıncılık.
21. Tekin N, Rose AG, Apel Y, Yurdaydın N, Yavaş Y, Daşkın A, Keskin O, Ethem H (1991) *Östrusları sinkronize edilen koyunlarda sun'i tohumlama yöntemiyle elde edilen dölverimi.* AÜ Vet Fak. Derg, **38**, 60-73.
22. Tekin N, Günzel AR (1986) *Koç spermasının değişik sulandırılarda dondurulması ve in vitro değerlendirme yöntemleri üzerinde araştırmalar.* AÜ Vet Fak Derg., **33**, 381-393
23. Tekin N (2000) *Yetiştiricilikte sun'i tohumlamanın önemi.* Türkiye-2000 Hay Kongr, 57-64 Kızılcama-Ankara.
24. Watson, P.F., Martin, I.C.A. (1975): *Effects of egg-yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa.* Aust. J. Biol. Sci. **28**, 153-159
25. Windsor, P.P., Szell, A.Z., Buschbeck, C., Edward, A.Y., Milton, T.T.B., Buchrell, B.C. (1994): *Transcervical artificial insemination of Western Australian Merino ewes with frozen-thawed semen.* The-riogenology, **42**, 147-157

Yazışma Adresi:

Dr. Ongun Uysal

AÜ Veteriner Fakültesi

Dölerme ve Sun'i tohumlama Anabilim Dalı

6110 Dışkapı/ANKARA