

KOÇ SPERMASININ DEĞİŞİK TEKNİKLER KULLANILARAK

SIVI AZOTTA PELET BİÇİMİNDE DONDURULMASI

(The freezing of Ram sperm in liquid nitrogen like pellet by using various methods)

Adnan EKİCİ (*)

GİRİŞ

Ülkemizde giderek artan nüfusun hayvansal protein ihtiyacını karşılamada ve yünlü dokuma sanayimizin yapağı ihtiyacını yurt içinden sağlamada büyük görevler yüklenen koyunculüğumuz giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Halkımızın temel beslenme alışkanlıkları ile ülkemizde yalnız koyunlar tarafından kullanılmaya elverişli geniş meraların varlığı koyun yetiştiriciliğinin önem ve geleceğini belirten öğelerdir. Bu duruma bağlı olarak Türkiye'de, çoğu ülkelerden çok sayıda, 42 milyon dolayında, koyun vardır (19). Bu sayısal çokluğa karşın yerli koyunlarımızın verimleri oldukça düşük düzeydedir. Bunun da nedeni koyun varlığımızın büyük bir bölümünün genetik verimi düşük koyun ırklarından oluşmasıdır.

Yerli koyun ırklarımızın ıslahı çalışmalarına diğer hayvan türlerinde olduğu gibi Cumhuriyetin kuruluşundan sonra başlanmıştır. İlk Marmara ve Trakya Bölgemizin yerli koyunu olan Kıvırcık koyunlarının dışarıdan getirilen Merinos koçları ile çevirme melezlemesi yoluyla mezlenerek ve özellikle sun'i tohumlama yöntemi kullanılarak ıslahı yoluna gidilmiştir. Bu sayede, bugün sayıları 1 milyonu aşan Merinos koyun varlığına ulaşılmıştır (8). Daha sonraları bu melezleme çalışmaları Orta ve Doğu Anadolu Bölgelerine kaydırılmış, Akkaraman ve Morkaraman koyun ırklarımızın Merinosla melezleme çalışmalarına başlanmıştır. Tüm bu çalışmalar sonucunda Karacabey ve Konya Merinosu adı verilen iki yeni tip elde edilmiştir.

(*) Uzman Vet. Hekim - Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü

Koyunlarımızın ıslahı amacıyla yapılan melezleme çalışmalarında sun'i tohumlama yöntemi kullanıldığını yukarıda belirtmiştik. Bu yöntemin etkin bir biçimde kullanılmasının temel nedenleri bir yandan sınırlı sayıda ithal edilen Merinoş koçlarından azami ölçüde yararlanmak, diğer yandan da özellikle Orta Anadolu'da yapılan Akkaraman x Merinos melezlemelerinde Merinos koçlarının, Akkaraman koyunlarına tabii olarak aşamaması nedeniyle ortaya çıkan güçlüğü, sun'i tohumlama ile üstesinden gelmiştir.

Sun'i tohumlamanın halk elindeki koyunlarda uygulanmaya başlanması 1948 yıllarına rastlar (17). O tarihten bu yana yıllara göre sayıca artan koyun sun'i tohumlamalarında taze sperma kullanılmaktadır. Bugünkü uygulamada sun'i tohumlama teknisyenleri, hazırlanan program uyarınca çeşitli yörelerde açılan istasyonlara giderek, çiftleşme dönemi süresince köylerde ve köy gruplarında köylünün koyunlarını tohumlamaktadırlar. Bu durum iş gücü ve zamana gerek göstermekte, böylelikle ıslah çalışmalarının istenilen den daha az hızlı yapılmasını doğurmaktadır.

Son yıllarda Dünyada ve Ülkemizde koç spermasının dondurularak uzun süre saklanması yönünde çalışmalar yapılagelmıştır. Bu çalışmalardan iyi sonuçlar alınması halinde, teknisyenlerin bir istasyonda uzun süre kalması sorunu ortadan kalkacak, sığır sun'i tohumlamasında olduğu gibi günlük turlarla belirli köyleri içeren bir bölgedeki yerli koyunların kısa sürede tohumlanması olanağı doğacaktır. Bu sayede iş gücü ve zaman bakımından önemli bir tasarruf da sağlanmış olacağından, ıslah çalışmaları daha hızlı, daha ekonomik biçimde yürütülebilecektir.

Yukarıda değindiğimiz hususlar ancak koç spermasının dondurulması çalışmalarından iyi sonuçlar alınması halinde mümkündür. Dünyada çok sayıda araştırmacı bu konuda etkin araştırmalar yapmaktadırlar.

Bu araştırmalarda koç sperması başlıca iki yöntemle dondurulmaktadır.

- 1 - Paillet (payet) yöntemi
- 2 - Pelet yöntemi

Koç spermasının payet yöntemi ile dondurulması konusunda Ülkemizde yapılan çalışmalar vardır (7, 18). Biz bu çalışmalarımızda Ülkemizde ilk kez denenen koç spermasının mayi azot buharında ve pelet tipinde dondurulması üzerinde çalıştık.

Kuru buz (katı Co_2) üzerinde koç spermasının pelet biçiminde dondurulmasıyla ilgili yapılmış bilimsel çalışmalardan, öbür tip dondurma tekniklerinden, çok daha iyi sonuçlar alınmasını gözönünde tutarak, hem daha ekonomik, hem Türkiye koyun sun'i tohumlamasında büyük pratik kolaylık ve yarar sağlayacağı düşüncesiyle bu araştırmayı yaptık.

LİTERATÜR BİLGİSİ

Koç spermasını ilk kez 1955 yılında Emmens ve Blackahaw (5) düşük ısı derecelerinde dondurdu. Bu tarihten sonra çeşitli araştırmacılar çeşitli teknikler kullanarak koç spermasını dondurmuşlardır.

Fraser (6), koç spermasını pelet biçiminde dondurdu. Amacı basit bir sulandırıcı ve düşük gliserol konsantrasyonu kullanmak ve ekilibasyon süresini kısa tutmaktı. Pelet biçiminde dondurulan koç sperması ile iki kızgınlık periyodunda yapılan tohumlamalardan % 56 - 60, üç kızgınlık periyodunda yapılan tohumlamalardan da % 80 gebelik oranı elde edildi.

Salamon (15) koç spermasını rafinoz - glikoz - yumurta sarısı - sitrat solusyonu ile sulandırdı. Kuzu buz üzerinde -79°C de pelet biçiminde dondurdu ve sıvı azot içerisinde 36 ay muhafaza etti. Peletler sodyum sitrat solusyonu içinde çözüldü ve santrifije edilmek suretiyle yoğunlaştırıldı. Taze koç sperması ise glikoz - sodyum sitrat - yumurta sarısı solusyonu ile sulandırıldı ve daha sonra santrifije edildi. Dondurulmuş ve taze sperma ile yapılan tohumlamalarda doz 0.1 ml. idi ve her bir doz $140 - 160 \times 10^6$ aktif spermatozoit ihtiva ediyordu. İntra vaginal sünger yöntemiyle sinkronize edilen yerli Merinos koyunları, sinkronizasyondan sonra ikinci östrüste tohumlandı. Dondurulmuş sperma ile tohumlanan 172 koyundan % 52.9 u, taze sperma ile tohumlanan 153 koyundan da % 76.5 i doğurdu.

Salamon (16), 156 ve 162 koyunluk iki sürüyü pelet biçiminde dondurup erittiği spermayla tohumladı. Kuzulama oranları her iki sürüde de sırasıyla % 51.3 ve % 54.9 idi. 138 başlık iki sürüyü de taze spermayla tohumladı. Bu kezde kuzulama oranları % 73.9 ve % 78.3 ü buluyordu. Aynı östrüste iki kez tohumlama uyguladığı gruplarda ister taze, ister dondurulmuş spermayla olsun döl verimi yönünden önemli artışlar sağladı. İkinci dönemde, spermayı -79°C ve -140°C de pelet biçiminde dondurdu. 191 koyunu -79°C de pelet biçiminde dondurduğu sperma ile tohumladı, % 48.2 doğum oranı elde etti, 187 koyunu ise -140°C de pelet biçiminde dondurduğu sperma ile tohumladı, bu kezde % 44.9 doğum oranı elde etti. Yazar, çift tohumlamanın tek tohumlamaya nazaran daha iyi sonuç verdiğini kaydetmektedir.

Volkov (22), koç spermasını ilkin santrifije edilmiş laktoz - yumurta sarısı sulandırıcısı ile 1:1 oranında daha sonrada % 3.5 - 4.0 gliserol içeren santrifije edilmiş bir solusyonla yine aynı oranda sulandırdı. Spermayı pelet biçiminde sıvı azotta dondurdu. Sperma çözüldükten sonra küçük delikli filitrelerde alçak basınç altında filtre edildi. Spermatozoitten zengin olan ve filitrenin üstünde kalan sperma bölümü bir spatül ile alınarak, 17 koyun 0.1 cm^3 ($150 - 200$ milyar spermatozoit / cm^3) lük dozlarla tohumlandı ve ovumlar koyunların oviduktlarından yıkama yöntemiyle alındı. Ovumların % 53 ünün döllendiği gözlemlendi. 19 koyun ise $0.4 - 0.6 \text{ cm}^3$ çözülmüş filtre edilmemiş ($150 - 200$ milyar spermatozoit / cm^3), 13 koyunda 0.1 cm^3 filtre edilmemiş ($30 - 50$ milyar

spermatozoit / cm^3) sperma ile tohumlandı. Ovumların dölleme oranları sırasıyla % 32 ve % 15 oldu. 1972 -- 1973 yıllarında, 735 koyun aynı östrüste iki kez olmak üzere çözülmüş, filtre edilmiş sperma ile (200 - 400 milyar spermatozoit / cm^3) tohumlandı. Ortalama gebelik oranı % 54.0 (% 36.5 – 58.8) olarak bulundu.

Varnavski ve Turbin (20), Romney Marsh koyunlarının spermalarını laktoz - yumurta sarısı - gliserol sulandırıcısı ile sulandırarak kuru buz üzerinde (-80°C) pelet halinde ve sıvı azot ile (-155°C) payet halinde dondurdular. Her iki yöntemde dondurulan sperma ile 35 ve 59 koyunu intra - servikal olarak tohumladılar. İlk tohumlamada elde edilen gebelik oranları sırasıyla % 23 ve % 31 idi.

Dziuk, Lewis, Graham ve Moyer (4) koç spermasını Tris sulandırıcısı ile 1:3 oranında sulandırıp pelet biçiminde dondurdular ve -196°C sıvı azotta sakladılar. 4 - 8 yaşlı ve kızgınlıkları sinkronize edilen koyunlardan 58 i tabii aşım, 56 sı taze sperma ile sun'i olarak ve 56 sıda dondurulmuş spermayla yine sun'i olarak tohumlandılar.

Doğum oranları ilk tohumlamada sırasıyla % 69, % 48 ve % 13 olarak bulundu.

Lopatko (12) koç spermasını Sakkaroz - yumurta sarısı sulandırıcısının gliserol içeren ve içermeyen bölümleriyle sulandırdı ve kuru buz üzerinde pelet biçiminde dondurdu. Her iki sulandırıcı bölümünde de spermatozoit motilitesi sulandırmadan sonra % 82 ve % 82, ekilibasyondan sonra % 78 ve % 78, spermanın çözülmesinden sonra ise % 49 ve % 36 olarak bulundu.

Loginova ve Zheltobryukh (11) yaptıkları 48 denemede koç spermasını 3 ayrı sulandırıcı ile sulandırarak, 3 ayrı yöntemle dondurdular. Sulandırıcı olarak 1 - yumurta sarısı - glikoz - sitrat, 2 - yumurta sarısı - glikoz - fosfat ve 3 - yumurta sarısı - glikoz - magnezyum sulfat kullandılar. Spermanın dondurulmasında 1 - Kuru buz üzerinde dondurmak, 2 - Kuru buz üzerinde dondurup sıvı azot içerisinde bırakmak ve 3 - Sıvı azot buharı üzerinde dondurmak gibi 3 yöntem uyguladılar. Araştırmacılar sitrat ve fosfat sulandırıcılarının en iyi sonuç verdiğini bildirmektedirler. 37 koyundan 17 sini intra - uterin, 20 sini intra - servikal tohumladılar. Gebe kalan koyun sayısı sırasıyla 15 ve 2 idi.

Kalev, Marinov, Zagorski, Kitchev, Bakrdzhiev ve Zhekov (9), 4 ayrı ırktan aldıkları koç spermalarını (1) glikoz - yumurta sarısı - gliserol - sitrat, (2) Laktoz - yumurta sarısı - gliserol sulandırıcısı ile sulandırıp pelet biçiminde -120° de dondurdular. Aktif spermatozoit oranları taze spermadan 4 ırkta sırasıyla % 93.4, % 90.1, % 92.7 ve % 91.9 idi. Dondurduktan sonra çözülen spermada aktif spermatozoit oranları dört ırkta sırasıyla birinci sulandırıcı ile % 56.5, % 56.0, % 53.7 ve % 52.3 idi. İkinci sulandırıcıda ise % 51.4, % 53.8, % 51.1 ve % 49.8 olarak bulundu. 340 ve 560 koyunluk iki sürüde iki sulandırıcı ile sulandırılıp dondurulan spermalar ile uygulanan tohumlama sonucu elde edilen gebelik oranları % 44.4 ve % 48.1, doğum oranları ise % 24.8 idi.

Mielikovic, Naumov, Atanasov, Mihailovski, Mrvos, Tanev, Stovadinovic ve Stojanovic (13), 5 koçun spermasını % 2 - 3 gliserol, % 20 yumurta sarısı ve antibiotik içeren laktoz sulandırıcısı ile sulandırdılar. İki saatlik ekilibrasyon süresi sonunda 0. 1 cm³ dozlar halinde pelet biçiminde kuru karbondioksit buzu üzerinde dondurup sıvı azot içerisinde muhafaza edilen koç spermasında, 180 gün sonraki motiliteyi yazarlar, % 52 olarak bildirmektedir. 110 tsgai ve 239 ovce Polje koyununun peletlerle tohumlanmasından, Tsgai koyunlardan 30 u, Ovce Polje koyunlarından 170 i doğurdu.

Kareta (10), koç spermasını yumurta sarısı - sitrat - gliserol sulandırıcısı ile sulandırıp plastik ampullerde sıvı azot buharında dondurarak, sıvı azot içinde 2 - 7 gün muhafaza etti. Donmuş spermayı 40° C - 60° C de çözdükten sonra 53 ve 42 koyunluk iki sürüyü aynı östrüde iki kez olmak üzere 30 - 60 milyon aktif spermatozoit içeren 0. 2 cm³ lük sperma dozuyla tohumladı. Tohumlanan koyunların % 22. 6 ve % 23. 5 i tekrar kızgınlığa gelmedi.

Aminov (2), haftada iki kez aldığı 5 koçun ejakülatlarını, laktoz - yumurta sarısı-gliserol sulandırıcısı ile 1:1 veya 1:3 oranında sulandırdı. 4 saatlik ekilibrasyon süresi sonunda ampuller içinde ve kuru buz üzerinde dondurduğu spermayı sıvı azot içerisinde muhafaza etti. Araştırmacı dondurmadan önceki spermatozoit motilitelerini sulandırma oranlarına göre sırasıyla % 89 ve % 88, çözüldükten sonraki spermatozoit oranında % 42 ve % 39 bulunduğunu bildirmektedir.

Visser (21), çeşitli dondurma yöntemlerini karşılaştırdığı çalışmasında koç spermasının pelet ve payet biçiminde kuru buz ve sıvı azotla dondurdu. Sonuç olarak yazar, spermanın pelet biçiminde ve kuru buz üzerinde dondurulmasının, sıvı azotta payet ve pelet olarak dondurulmasına nazaran daha iyi sonuç verdiğini bildirmektedir.

MATERYAL VE METOD

Araştırmanın hayvan materyalini Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsünde mevcut ikisi Karacabey, birisi de Konya Merinosu olan üç koç oluşturmuştur. Koçlar sifata alınmadan önce Enstitüce hazırlanan normal bir rasyonla beslenmiştir.

Araştırmada kullandığımız koçların belli sayıda ejakülatları üç ayrı sulandırıcı ile sulandırıp gliserilizasyon ve ekilibrasyon işlemlerinden sonra üç yöntem kullanarak pelet biçiminde donduruldu. Gerek dondurmadan önce, gerekse dondurmadan sonraki spermatozoit motiliteleri ayrı ayrı saptandı.

Sperma sulandırıcısı olarak üç değişik solusyon kullanılmıştır .

1 – Sodyum sitrat - glikoz - yumurta sarısı sulandırıcısı (14).

Bileşimi:

Sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.37 gr.
Glikoz	0.80 gr.
Yumurta sarısı	20.00 cm^3
Damıtık su	100.00 cm^3

Bu sulandırıcıya ayrıca % 7 oranında gliserol katıldı.

2.37 gr. sodyum sitrat ve 0.80 gr. glikoz 100 cm^3 damıtık suda eritilerek buna 20 cm yumurta sarısı ilave edildi. Sulandırıcı iki bölüme ayrılarak bir bölümü olduğu gibi bırakıldı. Diğer bölümü tüm sulandırıcıda % 7 oranında bulunacak şekilde gliserol katıldı. Her iki sulandırıcı bölümü kullanılıncaya kadar + 5 derecede buzdolabında saklandı. Sulandırıcı kullanılmadan önce genellikle 15 - 20 saat önce hazırlandı.

2 – Laiciphos Sulandırıcısı (3).

Bileşimi:

Laiciphos 271	6.25 gr.
Yumurta sarısı	12.5 cm^3
Damıtık su	62.5 cm^3

Bu sulandırıcıya ayrıca % 7 oranında gliserol katıldı.

6.25 gr. Laiciphos 271, 50 cm^3 bidistile su içerisinde 40° C eritilip, buna 25° C deki 12.5 cm^3 yumurta sarısı ve 62.5 cm^3 bidistile su ilave edildi. Hazırlanan bu solusyon iki bölüme ayrıldı.

I. Bölüm : 37.5 cm^3 solusyon

2. Bölüm : 32.5 cm^3 solusyon + 4.9 cm^3 gliserol

Her iki sulandırıcı bölümü kullanılıncaya kadar buzdolabında bekletildi.

3 – Laktoz - yumurta sarısı sulandırıcısı (22).

Bileşimi:

Laktoz	11.0 gr.
Yumurta sarısı	20.0 cm^3
Damıtık su	100.0 cm^3

Bu sulandırıcıya ayrıca % 7 oranında gliserol katıldı.

11. 0 gr. laktoz, 100 cm³ bidistile su eritilip bunun 73 cm³ lük bölümüne 20 cm³ yumurta sarısı ilave edildikten sonra sulandırıcı iki bölüme ayrıldı. Birinci bölüm olduğu gibi bırakıldı, ikinci bölüme tüm sulandırıcıda % 7 oranında bulunacak şekilde gliserol katıldı. Her iki sulandırıcı bölümü kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı.

Sperma koçlardan sun'i vajen ile alındı. Sperma almada kullanılan vajen 20 cm. uzunluğunda madeni bir silindir ve bunun içine giren madeni silindirden daha uzun vajen lastiğinden oluşmaktadır.

Sun'i vajen madeni silindir içerisine geçirilen lastiğin artan her iki ucu silindir üzerine bükülerek lastik bantlar ile tesbit edilmek suretiyle hazırlandı. Sperma alma kadehi sun'i vajenin bir ucuna geçirilip, basıncı sağlamak için içerisine hava üflendi. Sun'i vajenin sıcaklığı, sperma alma esnasında 45°C yi bulacak şekilde içine konan su ile sağlandı. Ayrıca kayganlığı sağlamak amacıyla sun'i vajenin diğer ucuna saf vazelin sürüldü.

Sperma almada tahta bir masaya tesbit edilmiş kızgın olmayan bir koyun kullanıldı. Tekniğine uygun olarak alınan sperma süratle laboratuvara geçirilerek, gerekli makroskopik ve mikroskopik muayeneleri yapılmak üzere + 25 °C deki ılık su banyosuna konuldu.

Sperma önce makroskopik özellikleri yönünden incelendi. Spermanın miktarı, rengi ve kıvamı muayene edildi, daha sonra mikroskopik özelliklerine geçildi. Bir damla spermatozoit bir lam üzerine konularak, ışıklı tabla üzerinde mikroskopun küçük objektifi (10 x 10 büyütme) ile spermatozoitlerin toplu hareketleri incelendi. Daha sonra küçük bir damla sperma, lam üzerinde bir damla sulandırıcı ile karıştırılıp, üzerine bir lamel kapatılarak mikroskopun büyük objektifi ile (10 x 40 büyütme) bir yönde, hızlı hareketli spermatozoit oranı saptandı. Gerek makroskopik, gerekse mikroskopik yönden uygun özellik taşıyan spermalar dondurmada kullanıldı.

Spermanın sulandırılması, her bir tohumlama dozunda 100 x 10⁶ aktif spermatozoit bulunacak biçimde yapıldı.

Dondurmada kullanılacak sperma önce yoğunluk dikkate alınmak suretiyle sulandırıcının birinci yani gliserolsüz bölümüyle ılık su banyosu içerisinde sulandırıldı. İlk sulandırılması yapılan spermalar buzdolabında 45 dakika süreyle bırakılarak ısılarının + 5°C ye düşmesi sağlandı . Bu süre sonunda buzdolabından alınan ilk sulandırması yapılmış olan spermalar +5°C de çalışan soğutucu kabine götürüldüler.

Sulandırıcıların ikinci bölümü yani gliserol taşıyan bölümleri daha önceden soğutucu kabine konularak ısıları + 5°C ye düşürülmüştü.

Gliserol taşıyan sulandırıcı bölümü, ilk sulandırılması yapılan spermaya eşit aralıklarla ve 45 dakika süreyle konularak gliserolleme (gliserilizasyon) işlemi tamamlanmıştır.

Gliserilizasyon işlemi tamamlanmış olan sperma iki saat süreyle soğutucu kabinde alışıma (Ekilibrasyon) bırakılmıştır.

Gliserilizasyon ve ekilibrasyon işlemleri tamamlanmış spermanın pelet biçiminde dondurulmasında 3 değişik teknik kullanıldı.

I. TEKNİK

Dondurma işlemine başlamadan önce dondurma kazanındaki sıvı azot seviyesi ayarlanarak, dondurma ızgarasının üzerindeki buhar ısısının -80°C olması sağlandı.

Spermanın pelet biçiminde dondurulması için hazırlanan alüminyum kabın 0.2 cm^3 sperma alacak şekilde hazırlanmış yuvalarının bir kısmı olduğu gibi bırakıldı, ikinci sıra yuvalar alüminyum kâğıt ile, üçüncü sıra yuvalarda plastikle kaplanıp, kab dondurma kazanının ızgarası üzerine yerleştirildi. Alüminyum kab 10 dakika kadar burada bırakılarak soğuması sağlandı. Soğutucu kabinde 5°C bekletilen sulandırılmış sperma bir enjektör yardımıyla alınarak 0.2 cm^3 lük dozlar halinde dondurma kazanında soğutulmuş alüminyum kabın yuvalarına boşaltıldı.

Daha sonra dondurma kazanının kapağı kapatılarak sperma 7 dakika süreyle donmaya bırakıldı. Pelet biçiminde donan sperma yuvalardan alınarak sıvı azot içerisine daldırıldı.

II. TEKNİK

Birinci teknikte kullanılan $20 \times 10\text{ cm}$ boyundaki alüminyum kabın bir sırası olduğu gibi, bir sırası alüminyum kâğıt, bir sırası da plastikle kaplandı ve soğutucu kabin içerisine alındı.

Burada sulandırılmış sperma 0.2 cm^3 lük dozlar halinde ve bir enjektör yardımıyla yuvalara boşaltıldı. Alüminyum kabın üzeri spermanın sıvı azot buharı ile temasını önlemek amacıyla alüminyum kâğıtla kapatıldı. Soğutucu kabinden alınan alüminyum kab hemen dondurma kazanının içerisine alınarak, dondurma ızgarası üzerine konuldu. Kazanın kapağı kapatılarak 7 dakika süreyle donması sağlandı.

Pelet biçiminde donan spermalar alüminyum kabdan alınarak sıvı azot içerisine daldırıldı.

III. TEKNİK

Aluminyum kab, birinci teknikte olduğu gibi dondurma kazanının ızgarası üzerine yerleştirildi. 0. 5 cm³ hacmindeki kapaklı jelatin kapsüller yuvaların içerisine konuldu. Sulandırılmış sperma bir enjektör yardımıyla ve 0. 2 cm³ lük dozlar halinde jelatin kapsüllerin içerisine boşaltılıp kapakları kapatıldıktan sonra, dondurma kazanının kapağında kapatılarak sperma 7 dakika süreyle donmaya terkedildi. Donma işlemi tamamlandıktan sonra jelatin kapsüller aluminyum kabın üzerinden alınarak sıvı azot içerisine daldırıldı.

Her üç teknikle dondurulan peletlerin gerek sıvı azot buharında dondurulduktan sonra, gerekse sıvı azot içerisinde muhafaza edildikten sonraki mikroskopik muayeneleri ayrı ayrı yapılmıştır.

I. ve II. teknikle elde edilen peletler, fizyolojik tuzlu su ve kullanılan sulandırıcının ilk kısmıyla çözülmüş, III. teknikle elde edilen peletler ise jelatin kapsüllerin + 40°C deki su içerisinde konulması suretiyle eritilmişlerdir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Birinci teknikle yani aluminyum kab dondurma kazanının içerisinde iken +5°C deki sulandırılmış gliserilizasyon ve ekilibasyonu tamamlanmış spermanın enjektörle aluminyum kabın yuvalarına doldurulması suretiyle hazırlanan peletlerin fizyolojik tuzlu su ve kullanılan sulandırıcının birinci bölümüyle eritildikten sonraki muayenesinde hareketli spermatozoit saptanamamıştır. Oysaki bu spermanın dondurulmadan önceki motilite oranı % 65 idi. Bu yöntemle peletler şekil itibariyle istenilen özellikte olup, yuvalardan normal olarak çıkarılabilmekte idi.

İkinci teknikte, yani aluminyum kabın yuvaları soğutucu kabin içerisinde doldurulup, buradan direkt olarak dondurma kazanı içerisindeki ızgara üzerine konularak elde edilen peletlerin birinci teknikte olduğu gibi eritildikten sonra yapılan muayenesinde % 8 oranında hareketli spermatozoitlere rastlanmıştır. Bu teknikle elde edilen peletler yuvalardan çıkarılırken çoğu kez kırılmış ve parçalanmışlardır. Bu teknikte spermanın dondurulmadan önceki motilitesi % 65 idi.

Üçüncü teknikte, yani spermanın jelatin kapsüller içerisinde dondurulmasından sonra elde edilen peletlerin muayenesinde % 20 oranında hareketli spermatozoitler saptanmıştır. Ancak peletleri çözme esnasında, kapsül kapaklarının yırtıldığı, eridiği ve zamp kıvamını aldığı görülmüştür. Bu yöntemde de spermanın dondurmadan önceki motilitesi % 65 idi.

Materyal ve metod bölümünde belirtildiği gibi birinci yöntemde üç sıra halinde yuvaları kapsıyan aluminyum kabın birinci sırası olduğu gibi bırakılmış, ikinci sırası aluminyum kâğıt, üçüncü sırasıda plastikle kaplanmıştı. Bu teknikle pelet halinde dondurulan

spermanın çözülmesinden sonra her üç yuvadanda elde edilen peletlerde canlı spermatozoitlere rastlanılmaması, alüminyum kâğıt ve plastiğin motilite üzerinde etkili olmadığını göstermiştir.

Kuru buz üzerinde pelet biçiminde dondurmada amaç spermanın ani dondurulmasıdır. Kuru buzun sıcaklığı her yerinde aynıdır. Oysaki sıvı azot buharında pelet biçiminde dondurmada ise kazanın kapak seviyesi ile sıvı azota yakın kesimlerin arasında belirgin bir ısı farkı bulunmaktadır. Enjektör içerisindeki spermanın, kazanın kapağından ızgara üzerindeki alüminyum kaba varıncaya kadar ve dökülme anında değişik ısılara maruz kaldığı görülmektedir. Bundan spermanın ani olarak değilde tedrici olarak dondurulması sonucu çıkarılabilir. Bu yüzden spermatozoitlerin bir soğuk şokuna uğruyabilme olasılığı güçlenmektedir. Tüm spermatozoitlerin ölmüş olması şok olasılığını kuvvetlendirmektedir.

İkinci teknikte bu kez alüminyum kabın yuvaları soğutucu kabinde sulandırılmış sperma ile doldurulduktan sonra üzeri alüminyum kâğıtla sıkıca kapatılmıştır. Bu teknikte dondurulan peletlerde motilitenin düşük olmasının bir nedeni alüminyum kabın sıvı azotun hemen üzerinde bulunan ızgaraya konulmasına kadar geçen süre içerisinde gereği ölçüde soğumadığı ve bu suretle bir soğuk şokunun oluşabileceğidir. İkinci bir neden olarakta birinci teknikte açıklandığı biçimde sıvı azot buharının, kazanın kapak seviyesi ile ızgara arasındaki belirgin ısı farkıdır. Ancak bu teknikte dondurulan spermada % 8 oranında da olsa bir motilite elde edilmesi alüminyum kabın ve dolayısıyla spermanın üzerine örtülen alüminyum kâğıdın, soğuk şokunu bir ölçüde olsa önleyebildiğine bağlıyabiliriz.

Peletlerin bu teknikte yuvalardan çıkarılması esnasında yapışmasını ve parçalanmasını, alüminyum kabın önceden $+5^{\circ}\text{C}$ de bulunması ve ızgara üzerine konulunca yeterince soğumamasına bağlamak mümkündür.

Üçüncü teknikte sulandırılmış sperma kapaklı jelatin kapsüller içerisinde dondurulmuştur. Burada diğer tekniklere bakınca oldukça yüksek bir motilite elde edildiği görülmektedir. Diğer iki teknikte de spermatozoit kayıplarına neden olarak gösterilen faktörlerin burada da etkin olabileceği düşünülebilir. Çünkü burada da birinci teknikte olduğu gibi sulandırılmış sperma enjektöre $+5^{\circ}\text{C}$ de çekilerek, sıvı azot buharının farklı ısıdaki kesimlerinden geçirilmek suretiyle ızgara üzerindeki alüminyum kabın yuvalarındaki jelatin kapsüllere doldurulmuştur. Enjektör içindeki spermanın buhardan geçerek farklı ısılara maruz kaldığı ve bir soğuk şokuna uğradığı, ancak jelatin kapsüllerin bir ölçüde ve fakat ikinci teknikte kullanılan alüminyum kâğıttan daha fazla olarak spermayı soğuk şokundan koruduğu saptanmıştır.

Çünkü ikinci teknikte % 8 oranında motilite elde edilebilmesine karşın, üçüncü teknikte motilite oranının % 20 ye ulaştığı görülmüştür.

ÖZET

Türkiye'de koyun ıslahı alanında önemli bir yeri bulunan sun'i tohumlamanın daha ekonomik ve etkin bir biçimde yapılmasında koç spermasının dondurularak kullanılması konusu gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Pelet tekniğiyle spermanın dondurulmasında diğer dondurma tekniklerine nazaran daha iyi sonuçlar alındığı literatür kaynaklarında bildirilmektedir.

Çalışmamızda, koz spermasının değişik üç sulandırıcı ve üç teknik kullanarak pelet biçiminde ve sıvı azot buharında dondurulmasını amaçladık.

Araştırmada hayvan materyali olarak Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsünde mevcut 3 baş Merinos koçu kullanılmıştır.

Koçlardan sun'i vajenle alınan sperma gerekli makroskopik ve mikroskopik muayeneleri yapıldıktan sonra sodyum sitrat - glikoz - yumurta sarısı, Laiciphos - yumurta sarısı, Laktöz - yumurta sarısı sulandırıcıları ile sulandırılıp 0.2 cm^3 lük tohumlama dozunda 100×10^6 aktif spermatozoit bulunacak biçimde gliserilizasyon ve 2 saatlik ekilibrasyondan sonra 3 ayrı teknik kullanarak sıvı azot buharında pelet biçiminde donduruldu ve sıvı azot içerisinde muhafaza edildi.

I. teknikte kullanılan alüminyum kabin yuvalarının bir sırası olduğu gibi bırakıldı, ikinci sırası alüminyum kâğıtla, üçüncü sırasıda plastikle kaplandı. Kap dondurma kazanının ızgarası üzerinde iken enjektörle alınan sulandırılmış sperma 0.2 cm^3 lük dozlar halinde yuvalara boşaltıldı. 7 dakika süreyle sıvı azot buharında dondurulan peletler sıvı azot içinde muhafaza edildi.

II. teknikte birinci teknikte olduğu gibi hazırlanan alüminyum kabin yuvaları bu kez soğutucu kabin içerisinde 0.2 cm^3 sulandırılmış sperma ile dolduruldu ve kab alüminyum kâğıtla sarılarak dondurma kazanının ızgarası üzerine alındı. 7 dakika sıvı azot buharında bırakılarak peletler hazırlandı. Peletler sıvı azot içerisinde muhafaza edildi.

III. teknikte alüminyum kab dondurma kazanının ızgarası üzerinde iken yuvalara jelatin kapsüller konuldu. Sulandırılmış sperma enjektörle 0.2 cm^3 lük dozlar halinde jelatin kapsüllere boşaltıldı. 7 dakika süreyle sıvı azot buharında bırakılan kapsüller, bu sürenin sonunda sıvı azot içerisinde muhafaza edildi.

I. teknikle hazırlanan peletlerin eritilmesinden sonra yapılan mikroskopik muayenesinde hareketli spermatozoite rastlanmadı. Oysa dondurmadan önceki aktif spermatozoit oranı % 65 i buluyordu.

II. teknikle hazırlanan peletlerin eritilmesinden sonra yapılan mikroskopik muayenesinde aktif spermatozoit % 8 olarak bulundu. Oysa dondurmadan önceki motilite oranı % 65 idi.

III. teknikle hazırlanan peletlerin eritilmesinden sonra yapılan mikroskopik muayenesinde % 20 oranında aktif spermatozoite rastlanıldı. Oysa dondurmadan önceki motilite oranı % 65 idi.

Literatür kaynaklarında kuru buz üzerinde pelet biçiminde dondurulan spermalar-dan iyi döl verimi sonuçları alındığı bildirilmektedir. Spermanın kuru buz üzerinde pelet biçiminde dondurulmasında ani donma söz konusudur. Oysa bizim yaptığımız denemeler-de dondurma işlemine başlamadan saptanan motilite oranlarının çok yüksek olmasına rağmen, peletlerin eritilmesinden sonraki motilitenin düşük bulunması çeşitli nedenlerle hızlı bir donmanın sağlanamaması sonucu soğuk şokundan ileri gelebilir. Bu durumun önlenmesini içerecek bilimsel araştırmalarda böylesi bir teknikle koç spermasının dondu-rulabilmesini olası görmekteyiz.

SUMMARY

Day by day the use of frozen ram sperm in artificial insemination is being more important as it is more economical and effective and it has very important place in sheep breeding of Turkey.

It has been reported that the use of the pellet technic in the freezing of sperm is much better than the other technics used in freezing of sperm.

In our research we aimed to freeze ram sperm by using three different dilutions and three different technics in liquid nitrogen vapor.

The semen of 3 Merino ram of the Lalahan Zootechnical Research Institute were used. After semen collections by artificial vagina macroscopical and microscopical examination of semen samples were made and they were diluted in Sodium Citrate - Glucose - Egg Yolk, Laiciphos - Egg Yolk, Lactose - Egg Yolk to have 100×10^6 active spermatozoa in each 0.2 cm^3 insemination dose.

After having equilibrated for two hours, they were frozen in liquid nitrogen vapor in pellet form using 3 different technics and were kept in liquid nitrogen first section of the first row of the aluminium cup was left as the same in the first technic, second section was covered with aluminium foil, the third section was covered with plastic sheath. As the cup was on the shelf of freezing tank, the diluted semen which was taken with a syringe was emptied to the section in 0.2 cm^3 doses. The pellets which were frozen in liquid nitrogen vapor were kept in liquid nitrogen for 7 minutes.

In the second technic the aluminium cups were prepared as in the first technic and the section of aluminium cups were filled with 0.2 cm³ diluted semen in a frozen cup and the cup was taken to the shelf of the freezing tank after having been rolled with aluminium foil. The pellets were frozen after having been kept in liquid nitrogen vapor and stored in liquid nitrogen.

In the third technic as the aluminium cup was on the shelf of freezing tank, semen in gelatin capsules were put in the holes of the sectcons. The diluted semen were injected to the gelatine capsules is 0.2 cm³ doses. The capsules which were kept in liquid nitrogen vapor were there kept in liquid nitrogen.

After melting the pellets which were prepared as is the first technic there were no motile spermatozoa in the microscopical examination, whereas 65 % motile spermatozoa was detected before freezing.

After melting the pellets which were prepared as in the second technic there was an average of 8 % motile spermatozoa in the microscopical examination whereas the rate of motility was 65 %, before freezing.

After melting the pellets which were prepared as in the third technic there was 20 % motile spermatozoa in the microscopical examination whereas the rate of motility was 65 % before freezing.

In various literatures it has been reported that the sperms which were frozen on dry ice as pellets give the best result. It is the means of quick freezing for the sperm to be frozen on dry ice, like pellets, whereas in our experiments the rate of motility calculated before starting to freeze is much more higher than the proportion of motility calculated after the pellets were melted. From that we can conclude, the poor motility rate might be due to some deficiencies of the technic used causing cold shock to sperms.

LITERATÜR

- 1— AAMDAL, J. and ANDERSEN K. (1968): *Freezing of semen in straws*. VI Congr. Int. Reprod. Anim. Insem. Artif. 1968 Paris .
- 2— AMINOV, R. M. (1974): *Freezing of ram semen (asquated) in Anim. Bred. Abstr.* 1974, 20: 35 - 38.
- 3— CASSAU, R. (1975): *The french straw technique*, A. L. Co - Opcentre, 61 - L Aigle (France).

- 4 — DZIUK, P. J., J. M. LEWIS, E. P. GRAHAM and R. H. MOYER (1972): Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen semen at an appointed time in the ewe. *J. Anim. Sci.* 75 (3): 572 - 575.
- 5 — EMMENS, C. W. and A. W. BLACKSHAW (1955): The Fertility of frozen ram bull semen. *Austr. Vet. J.* 31: 76 - 79.
- 6 — FRASER, A. F. (1968): Progres in the artificial insemination of sheep with frozen semen. VI Congr. Int. Reprod. Anim. İnsem. Artif. Paris. 1968
- 7 — GÖKÇEN, H. (1976): Koç spermasının kimi özellikleri, dondurulması ve dondurulan spermanın döl verimi üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yayınları. Yayın No. 48
- 8 — Hayvancılık, hayvan ıslahı ve üretimi alt komisyon raporu. T. C. Başbakanlık Plânlama Teşkilâtı Yayınları. Yayın No: Dpt - 1535 - Oik: 229.
- 9 — KALEV, G. P. MARİNOV, D. ZAGORSKI, G. KITCHEV, BAKRDZHİEV K. and G. ZHEKOV (1971): Effect of semen diluents on viability of deep frozen ram spermatozoa. (Asquated) in *Anim. Breed. Abstr.* 1972, 40 (1): 608.
- 10 — KARETA, W. (The freezing of semen) (Asquated) *Anim. Breed. Abstr.* 1973. 41 (9): 4027.
- 11 — LOGİNOVA, N. V., N. A. ZHELTOBRYUKH (1973): Survival rate and fertilising ability of frozen ram semen. *Anim. Breed. Abstr.* 41 (4): 1680.
- 12 — LOPATKO, M. J. (1973): Possibility of freezing semen without glycerol (Asquated) in *Anim. Breed. Abstr.* 42: 2203.
- 13 — MİELİKOVİC, V., N. NAUMOV, L. ATANASOV, P. MİHAİLOVSKI, G. MRVOS, D. TANEV, V. STOVADİNOVİC and R. STOJANİVİC (1975): Contribution to the method of preservation of the ram sperm in liquid nitrogen (Asquated) in *Anim. Breed. Abstr.* 1975, 43 (1) 4606.
- 14 — MİLOVANOV, V. K. (1962): Biology and reproduction and artificial insemination of animals. *Lzd. Selk. Hoz. Lit. Moscow* (Asquated) in paufle S. K. und mitautoren. (1974): Künstliche Besamung und Eitronsplantation bei Tier und Mensch verlag M - H, Schaper, Hannover.
- 15 — SALAMON, S. (1971): Fertility of ram spermatozoa following pellet freezing on dry ice at -79 and -140°C . *Austr. J. Biol. Sci.* 24: 183.
- 16 — SALAMON, S. (1972): Fertility of ram spermatozoa storad for three years. 7. Intern. Kongr. f. tier. Fortpflanzg. u. Künst. Besomung. München.
- 17 — SEVİNÇ, A. (1972) : Dölerme ve Sun'ı Tohumlama A. Ü. Vet. Fakültesi Yayınları, No: 284, Ankara.

- 18— SEVİNÇ, A., H. GÖKÇEN, K. ÇETİNKAYA, O. YANIL (1978): Çeşitli sulandırıcılar ve ekilibasyon süreleri kullanarak sıvı azotto dondurulan koç spermasının döl verimi üzerinde araştırmalar. T. B. T. A. K. Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Grubu, Proje No: VHAG — 384.
- 19— Tarım İstatistikleri Özeti (1975): Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Yayınları No: 781, D. İ. E. Matbaası, Ankara.
- 20— VARNAVSKİ, A. N., and V. F. TURBİN (1974): Luprovement of ram semen freezing methods (Asquated) in Anim. Breed. Abstr. 1975, 43 (10): 4619.
- 21— VISSER, D. (1974): The effect of freezing method on the surviva of ram spermatozoa. South. African Journal of Animal Science, 1974, 4 (2): 157 - 163.
- 22— VOLKOV, A. S. (1974): The effect of number of motile spermatozoa on conception rate in sheep. Zhivod. 10: 69 - 71 (Asquated) in Anim. Breed. Abstr. 1975, 43: 3.