

BOĞA SPERMALARININ FARKLI SULANDIRICILAR İLE DONDURULMASI VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ*

(Freezing of Bull Semen with Different Extenders and In Vitro Evaluation)

Ertuğrul BOZKURT¹

Necmettin TEKİN²

1.Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, ANKARA

2. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'ı Tohumlama Anabilim Dalı, ANKARA

*. Bu çalışma aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

ÖZET

Bu çalışmada, in vitro olarak sulandırma ve çözümlenme sonrası boğa spermasının spermatozojik özellikleri üzerine Biociphos, Laiciphos, Sitrat ve Tris sulandırıcılarının etkisi incelenmiştir.

Sperma örnekleri (toplam 20 ejakülat) iki boğadan alınmış ve ortalama sperma miktarı (ml), spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^6$ sp./ml), spermatozoa motilitesi (%), ölü spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (%) ve pH değeri sırasıyla 7.12 ± 0.42 , 1083.00 ± 63.50 , 75.25 ± 1.33 , 18.95 ± 1.01 , 20.68 ± 1.67 ve 6.72 ± 0.05 olarak tespit edilmiştir.

Biociphos, Laiciphos, Sitrat ve Tris ile sulandırılmış spermada ortalama motil spermatozoa yüzdeleri ve pH değerleri sırasıyla 60.89 ± 2.66 ve 6.48 ± 0.02 ; 63.30 ± 1.25 ve 6.20 ± 0.05 ; 45.72 ± 1.97 ve 6.50 ± 0.00 ; 58.96 ± 2.62 ve 6.50 ± 0.03 olarak saptanmıştır.

Biociphos, Laiciphos, Sitrat ve Tris sulandırıcıları ile dondurulmuş spermanın hemen çözümlenme sonrası ortalama motilitesi (%) sırasıyla 39.98 ± 1.77 , 43.60 ± 2.06 , 28.22 ± 1.79 , 41.89 ± 2.76 ve sulandırıcılardaki ölü spermatozoa, anormal spermatozoa yüzdeleri ile pH değerleri sırasıyla 52.00 ± 2.87 , 21.75 ± 1.62 ve 6.48 ± 0.02 ; 46.00 ± 2.86 , 23.68 ± 2.11 ve 6.08 ± 0.04 ; 62.40 ± 2.62 , 21.87 ± 1.28 ve 6.50 ± 0.00 ; 49.35 ± 3.57 , 22.00 ± 1.72 ve 6.50 ± 0.00 olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, boğa spermasında sulandırma ve çözümlenme sonrası in vitro motil spermatozoa neticelerine göre Laiciphos sulandırıcısı diğerlerinden cüzi derecede daha üstün olmakla beraber, Laiciphos, Tris ve Biociphos sulandırıcıları arasında istatistiki olarak önemli bir fark belirlenmemiştir.

Anahtar sözcükler: Boğa sperması, in vitro değerlendirme, sperma sulandırıcıları, spermanın dondurulması, spermanın çözümlenmesi.

SUMMARY

In this research, effect of Biociphos, Laiciphos, Citrate and Tris diluents on spermatozoological characteristics of bull semen after extending and thawing were examined as in vitro. Semen samples (in all 20 ejaculates) were collected from 2 bulls and average semen volume (ml), sperm concentration ($\times 10^6$ sp./ml), sperm motility (%), dead sperm (%), abnormal sperm (%) and pH value were determined as 7.12 ± 0.42 , 1083.00 ± 63.50 , 75.25 ± 1.33 , 18.95 ± 1.01 , 20.68 ± 1.67 and 6.72 ± 0.05 respectively.

The mean percentages of motile spermatozoa and pH values in semen diluted with Biociphos, Laiciphos, Citrate and Tris extenders were 60.89 ± 2.66 , 6.48 ± 0.02 ; 63.30 ± 1.25 , 6.20 ± 0.05 ; 45.72 ± 1.97 , 6.50 ± 0.00 and 58.96 ± 2.62 , 6.50 ± 0.03 respectively.

The mean motility (%) of frozen semen with Biociphos, Laiciphos, Citrate and Tris diluents were respectively 39.98 ± 1.77 , 43.60 ± 2.06 , 28.22 ± 1.79 and 41.89 ± 2.76 immediately after thawing and the percentage of dead, abnormal sperm

and pH values in diluents were determined 52.00 ± 2.87 , 21.75 ± 1.62 and 6.48 ± 0.02 ; 46.00 ± 2.86 , 23.68 ± 2.11 and 6.08 ± 0.04 ; 62.40 ± 2.62 , 21.87 ± 1.28 and 6.50 ± 0.00 ; 49.35 ± 3.57 , 22.00 ± 1.72 and 6.50 ± 0.00 respectively.

In this study, although Laiciphos diluent was slightly superior to others according to in vitro results of motile sperm in bull semen after extending and thawing, no significant differences were determined statistically between Laiciphos, Tris and Biociphos diluents.

Key Words: Bull semen, in vitro evaluation, semen diluents, semen freezing, semen thawing.

GİRİŞ

Bir boğanın ejakülatı gebeliği temin için gerekenden çok daha fazla spermatozoa ihtiva eder. Bu nedenle spermanın sulandırılarak bir çok dişinin tohumlanmasında kullanılması mümkündür. Bir ejakülat mevcut spermatozoa sayısına, kalitesine, boğanın fertilitate gücüne ve spermanın bırakıldığı yere göre çok misli sulandırılabilir (1,15).

Spermanın sulandırılmasında kullanılan materyaller oldukça farklı olup, bir laboratuvaradan diğerine veya ülkeden ülkeye değişebilmektedir. Sperma kalitesi ve fertilitesi yönünden en iyi sulandırıcıyı bulma konusundaki çalışmalar halen devam etmektedir. Bu konudaki araştırmalar soğutma dondurma işlemlerinin fiziksel yönü, sperma sulandırıcılarının bileşimi ve bu değişkenlerin birbirini etkilemesi üzerine yoğunlaşmıştır. Soğutma ve dondurma esnasında hücre membran bütünlüğünün bozulması, bu alandaki araştırmaları membran koruyucu maddeler ve onların etki mekanizmaları üzerine yönlendirmiştir. Yumurta sarısı ve süt uzun süre sperma koruyucusu olarak kullanılmış ve bir çok araştırmanın konusu olmuşlardır (7).

Donmaya maruz kalan canlı sistemlerdeki sıvıların pH ve tuz konsantrasyonları donma sırasında tuzların çökmesi ve buz kristalleri oluşumu esnasında ağır oranda değişmektedir. Bu değişiklikler ve buna bağlı hücre membran lipitlerindeki kayıplar donma hasarının en büyük nedenidir (34).

Sulandırıcılarda ozmotik basınç ve hidrojen iyon konsantrasyonunu ayarlamak için sitrat (2.9-trisodium citrate dihydrate), tris (hydroxymethyl) aminomethane, fosfat ve sitrik asit gibi tampon maddeleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteinleri kapsayan yağsız süt ürünleri de sulandırıcılar için buffer özelliğine sahiptir (1,23). Tris'in muhtemelen hücre içine nüfuz ederek K alımını düşürdüğü ve bu sayede yüksek orandaki K'ın soğutma esnasında spermatozoa üzerindeki olumsuz etkilerini azalttığı kabul edilmektedir (20).

Dondurulan spermatozoada metabolik aktivite geçici olarak durdurulduğundan enerji temini nispeten daha az önemlidir. Zira spermatozoitler dondurulmadan önce çoğunlukla sadece birkaç saat için aktif kalırlar. Ancak sperma soğutularak kullanıldığında spermatozoit metabolizması birkaç gün takviyeye ihtiyaç duyduğundan enerji temini daha önemlidir (1).

Unal ve ark. (31) yumurta sarısı-sitrat sulandırıcısındaki şekerler ve gliserolün boğa spermatozoası üzerine etkilerini araştırmış ve gliserol içermeyen bir sulandırıcıda fruktozun çözüm sonrası motilite üzerine yararının olmadığını, buna karşılık gliserol yoğunluğu arttıkça fruktoz miktarıyla orantılı olarak motilitenin düştüğünü tespit etmiştir. Steinbach ve Foot (28) ise, yumurta-sitrat-gliserol ve yağsız süt-gliserol sulandırıcılarında en büyük faydayı fruktozun sağladığını, fruktoz içermeyen bu sulandırıcılarda canlılık oranlarının çok düştüğünü, koruyucu madde olarak gliserol yerine kısmen fruktoz kullanılabileceğini, yumurta-tris-gliserol sulandırıcılarında ise fruktozun az etkili olduğunu bildirmiştir.

Spermada bulunabilecek spesifik patojen bakterilerin kontrolü için nativ sperma ve sulandırıcılara antibiyotiklerin katılması ilave bir güvenlik sağlar. Spermadaki bakteri miktarının önemli derecede artması da spermatozoaya zararlıdır. Sulandırıcılara antibiyotik ilave edilmesi ile ortaya çıkan ilk neticeler fertilité ve gebelik oranlarının arttığını göstermektedir (15,18).

Soğuk şoku adı verilen spermatozoanın ani olarak 25°C'den 0°C'a soğutulmasının yol açtığı geri dönülemez hasarın muhtemel sebebi hücre zarındaki bozulmadır. Hücre zarı permabilitesindeki değişim, K, enzimler, lipoprotein ve ATP'in hücre dışına sızmasına ve hücrelerin önemli oranda hasar görmesine neden olur. Aynı zamanda soğuk şoku neticesi boğa spermatozoasında motilite, solunum ve glikolizis'de önemli azalma oluşur (1,2).

Soğutmanın zararlı etkilerine karşı spermatozoayı korumanın en etkili yolu spermaya yumurta sarısı, süt veya bunların yapısında bulunan lipoprotein, lesitin, sefalin ve protein gibi büyük molekül ağırlıklı benzer bileşiklerin katılmasıdır (10,11,12,17,19,21).

Yassen ve Foote (33) medyumdaki % 20 yumurta sarısının boğa spermatozoası için yeterince Na, K ve Ca iyonu içerdiğini, daha yüksek oranların spermatozoaya zarar verdiğini bildirmiştir.

Donma esnasında hücreleri iki zararlı faktör, solüsyon ve hücre içi buz oluşumu etkilemektedir. Yavaş dondurmada hücrenin aşırı su kaybı hücre içi tuz konsantrasyonunun ve ozmotik basıncın artmasına ve hücredeki protein, lipoprotein ve akrozomun zarar görmesine neden olur. Hızlı dondurmada ise, ısı şoku ve az su kaybı neticesi oluşan hücre içi buz kristalleri hücre membranlarına zarar vermektedir. Bu nedenle dondurma işleminde solüsyon etkisini ve hücre içi buz oluşumunu azaltan yeterince hızlı veya yavaş dondurma oranları tercih edilmelidir (1,13,27). Gliserolün boğa spermasını dondurmak için klasik sulandırıcılara katılmasındaki amaç, buz kristalleri oluşumunu engellemektir (7).

Dondurulmuş sperma alanındaki çoğu araştırma sonuçları farklı boğalara ait spermaların dondurma işlemine değişik oranlarda tahammül ettiğini göstermektedir. Ana etkenler olan ne ekilibasyon süresi nede dondurma oranlarındaki büyük değişiklikler tahammül derecesindeki farklılığın başlıca kaynağı değildir (28).

Payetler daha mükemmel geometrik yapıya(yüzey/hacim oranı) sahip olduklarından donma-çözülme esnasındaki ısı değişikliklerine karşı ampullere oranla daha uyumludurlar. Spermatozoayı payette dondurma çalışmaları daha hızlı çözülme oranları ile daha fazla canlılık elde edildiğini ve çözüm sonrası motilitenin dondurma, çözülme ve gliserol oranlarından etkilendiğini göstermektedir (22,24,32).

Bu araştırmada boğalardan alınan spermalar yumurta sarısı ihtiva eden Sıtrat ve Tris, yumurta sarısı ve yağsız süt tozu içeren Laiciphos ve yumurta sarısı yerine soya proteini (promine-D) kapsayan Biociphos gibi farklı sulandırıcılar ile dondurulmuş ve çözülerek in vitro spermatolojik özellikleri değerlendirilmiştir. Böylelikle pratikte sıklıkla kullanılan ve kendilerine ait yöntemlerine göre sulandırılan dört farklı sulandırıcının spermatolojik özellikler üzerine etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

a-Materyal: Bu araştırmada, Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Sun’i Tohumlama Laboratuvarında sperma üretimi için bulundurulan 4 yaşında 2 baş Holstein Frisian (Siyah Alaca) boğa kullanılmıştır. Boğaların bakım ve beslenmeleri Enstitü şartlarında gerçekleştirilmiştir.

b-Metot: Araştırma süresince sun’i vajen yöntemiyle haftada iki kez birer defa olmak üzere her boğadan 10’ar ejakülat alınmıştır.

Spermanın in vitro değerlendirilmesinde; nativ spermanın renk ve kıvamı, miktarı, yoğunluğu, spermatozoa motilitesi, ölü spermatozoa oranı, pH değeri ve anormal spermatozoa oranı; sulandırılmış spermanın alışım dönemi sonunda spermatozoa motilitesi ve pH’sı; çözülmüş spermanın ise, spermatozoa motilitesi, pH değeri, ölü ve anormal spermatozoa oranları muayene edilmiştir (14,17,29).

Spermanın miktarı, sperma alma işleminden sonra dereceli sperma toplama kadehinde ml olarak saptanmıştır.

Sperma alındıktan sonra birim hacimde bulunan spermatozoa sayısı elektronik partikül sayaç yöntemi ile belirlenmiş ve spermatozoa/ml olarak ifade edilmiştir.

İleri doğru güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösteren spermatozoonlara oranı olarak ifade edilen motilite; nativ, sulandırılmış ve çözülmüş spermanın lam üzerindeki bir damlası üzerine lamel kapatılarak, phase-contrast ısıtma tablalı mikroskopta 200x büyütme ile üç değişik mikroskop sahasında belirlenmiş ve ortalama değer % olarak ifade edilmiştir.

Nativ ve çözülmüş spermadan alınan numuneler % 3 sodyum sıtrat solüsyonu içinde % 2 lik hazırlanan eosin boyası ile lam üzerinde froti çekilerek ışık mikroskopunda 400x büyütmede incelenmiştir. Mikroskop alanlarında en az 200 spermatozoon sayılarak,

boya alan spermatozoonlar ölü kabul edilmiş ve % olarak ifade edilmiştir.

Nativ ve çözülmüş sperma örneklerindeki spermatozoonlar Hancock solüsyonunda tespit edildikten sonra, bir damlası üzerine lamel kapatılarak ve sedir yağı damlatılarak ışık mikroskopunda 1000x büyütme ile en az 200 spermatozoa sayılmış ve anormal spermatozoa oranı % olarak belirlenmiştir. Spermatozoanın baş (akrozom dışındaki), akrozom, orta kısım ve kuyruk anomalileri ayrı ayrı değerlendirmeye alınmıştır.

Spermanın pH değeri sperma alındıktan hemen sonra, sulandırıldıktan sonra (dondurma öncesi) ve çözüm sonrası indikatör kağıt (5.5-9.0 Merck) kullanılarak belirlenmiştir.

Alınan ve kimi spermatolojik özellikleri yönünden değerlendirilen boğaların sperma örneklerinin her biri 4'e bölünmüş ve bölünen her bir kısım sulandırıcıların kendilerine ait sulandırma yöntemine uygun olarak Biociphos, Laiciphos, Sitrat ve Tris sulandırıcıları ile 0.25 ml'de toplam 22.5×10^6 spermatozoa bulunacak şekilde sulandırılmıştır. Laiciphos ve sitrat ile ilk sulandırma 32°C su banyosunda % 3 gliserol ihtiva eden sulandırıcının birinci bölümü ile yapılmış ve sulandırılan sperma 25°C'daki su banyosuna alınarak 1 saat içinde ısının 4°C'a düşmesi soğutma kabininde sağlanmıştır. Spermanın ısı 4°C'a düşürüldükten sonra % 11 gliserol içeren sulandırıcının ikinci yarısı 10'ar dakika ara ile üç eşit kısımda sulandırıcının ilk bölümüne ilave edilerek (gliserilizasyon) sulandırma işlemi tamamlanmış ve sperma

4°C'da 3 saat alışıma (ekilibrasyon) bırakılmıştır. Biociphos ve tris ile sulandırmada ise, % 7 gliserol içeren sulandırıcının tamamı bir defada su banyosunda (32°C) spermaya ilave edilmiş, soğutma (4°C) ve alışıma işlemleri aynı şekilde uygulanmıştır.

Gliserole alışıma süresi tamamlandıktan sonra otomatik doldurma cihazı ile 0.25 ml plastik payetlere çekilen sperma ısı ayarlı bilgisayarlı dondurma cihazına yerleştirilerek azot buharı ile sırasıyla üç safhada; 4°C/-10°C (5°C/d.), -10°C/-100°C (45°C/d.) ve -100°C/-140°C (20°C/d.) toplam 7 dakika içinde dondurulmuş ve -196°C'da sıvı azot içinde depolanmıştır.

Sulandırıcının cinsine göre farklı renkte payetlerde dondurulan sperma 35°C'da su banyosunda 12 saniyede çözülerek spermatozoa motilitesi, ölü spermatozoa oranı, pH değeri ve anormal spermatozoa (baş, akrozom, orta kısım, kuyruk) oranları tespit edilmiştir.

Araştırmada elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanmış, sulandırıcılar Friedman testi ile karşılaştırılmıştır. Farklılığı önemli olan grupların tespi-tinde parametrik olmayan çoklu karşılaştırma metodu kullanılmıştır. Boğaların spermatolojik özellikler yönünden karşılaştırılmasında ise, Mann-Whitney "U" testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Nativ Spermada: Boğaların nativ spermasında tespit edilen başlıca spermatolojik özelliklerinden sperma miktarı (ml), spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^6$ /ml), spermatozoa

motilitesi (%), ölü spermatozoa oranı (%), pH değeri ve anormal spermatozoa oranları (%) Çizelge 1 de verilmiştir.

I ve II nolu boğa arasında yapılan istatistiki değerlendirmede, spermatozoa motilitesi ($p<0.01$) ve spermatozoanın orta kısmına ait anormallik ($p<0.05$) bakımından grup ortalamaları arasındaki fark önemli bulunmuştur. Diğer spermatolojik özellikler yönünden grup ortalamaları arasındaki fark ($p>0.05$) önemli değildir (Çizelge 1).

Sulandırılmış ve Çözülmüş Spermada:

I ve II nolu boğalara ait sperma örneklerinde Biociphos, Laiciphos, Sitrata ve Tris ile sulandırma sonu (alışım sonrası) tespit edilen spermatozoa motilitesi ve pH değerleri ile donma-çözüm sonrası elde edilen spermatozoa motilitesi, ölü spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranı ve pH değerleri Çizelge 2, 3, 4 ve 5 de verilmiştir.

Sulandırıcılar arasında yapılan istatistiki değerlendirmede, sulandırma sonrası grup ortalamaları arasındaki fark sitrata sulandırıcısı için motilite yönünden ($p<0.01$), laiciphos sulandırıcısı için pH yönünden ($p<0.01$) önemli bulunmuştur (Çizelge 6).

Biociphos, laiciphos, sitrata ve tris sulandırıcıları ile çözüm sonrası elde edilen bulguların istatistiksel karşılaştırmasında ise, motil spermatozoa oranı, ölü spermatozoa oranı ve pH değerleri ($p<0.01$) ile anormal kuyruk oranları yönünden ($p<0.05$) farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğu saptanmıştır. Buna karşın sulandırıcıların anormal baş, akrozom, orta kısım ve toplam anormal spermatozoa oranları arasındaki fark önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur (Çizelge 7).

Çizelge 1: Nativ Spermada Spermatolojik Muayene Bulguları

	I Nolu Boğa n=10 X ± Sx	II Nolu Boğa n=10 X ± Sx	Ö.D.	n=20 X ± Sx
Miktar (ml)	7.20± 0.61	7.05±0.63	-	7.12±0.42
Yoğunluk ($\times 10^6$ /ml)	956.00±99.50	1210.00±59.50	-	1083.00±63.50
Motilite (%)	71.00±1.25	79.50±1.38	**	75.25±1.33
Ölü Sp (%)	20.50±1.71	17.40±0.92	-	18.95±1.01
pH	6.70±0.08	6.75±0.08	-	6.72±0.05
Anormal Sp (%)				
Baş***	5.15±0.73	5.10±1.06	-	5.12±0.62
Akrozom	0.45±0.13	0.25±0.11	-	0.35±0.08
Orta	4.50±0.98	2.00±0.53	*	3.25±0.61
Kuyruk	13.20±1.73	10.70±1.45	-	11.95±1.14
Toplam	23.30±2.19	18.05±2.32	-	20.68±1.67

* : $P<0.05$ (Grup ortalamaları arası fark önemlidir).
 ** : $P<0.01$ (Grup ortalamaları arası fark önemlidir).
 - : $P>0.05$ (Grup ortalamaları arası fark önemli değildir).
 Ö.D. : Önemlilik Derecesi
 *** : Akrozom dışındaki

Çizelge 2: Biociphos Sulandırıcısı İçin Sulandırma ve Çözüm Sonu Spermatozojik Muayene Bulguları

Ejekülat No	SULANDIRMA SONU		ÇÖZÜM SONU								
	PH	Motilite (%)	Motilite (%)	Ölü Sp Oranı (%)	Anormal Spermatozoa Oranı (%)					PH	
					Baş*	Akrozom	Orta	Kuyruk	Toplam		
1 No'lu Boğa	1	6.5	65.0	35.0	53.0	9.0	-	1.5	13.0	23.5	6.5
	2	6.5	50.0	40.0	59.0	4.0	1.0	10.5	15.5	31.0	6.5
	3	6.5	56.6	51.6	45.0	2.0	0.5	1.0	10.5	14.0	6.5
	4	6.5	53.3	40.0	33.0	6.5	2.0	7.5	13.0	29.0	6.5
	5	6.5	51.6	40.0	44.0	4.5	-	9.0	12.0	25.5	6.5
	6	6.5	48.3	40.0	49.0	2.0	1.0	10.5	9.5	23.0	6.5
	7	6.5	58.3	48.3	42.0	4.0	0.5	2.5	18.0	25.0	6.5
	8	6.5	40.0	33.3	59.0	5.0	-	1.0	10.0	16.0	6.5
	9	6.5	71.6	43.3	47.0	3.0	0.5	3.0	13.0	19.5	6.5
	10	6.5	41.6	36.6	45.0	3.0	-	3.0	10.5	16.5	6.5
N=10 X ± Sx	6.50±0.00	53.63±3.09	40.81±1.79	47.60±2.50	4.30±0.68	0.55±0.20	4.95±1.25	12.50±0.84	22.30±1.80	6.50±0.00	
2 No'lu Boğa	1	6.0	60.0	40.0	58.0	6.0	-	1.0	11.0	18.0	6.5
	2	6.5	70.0	60.0	17.0	8.5	1.0	1.5	32.5	43.5	6.5
	3	6.5	70.0	46.6	51.0	3.0	2.0	2.0	20.5	27.5	6.5
	4	6.5	50.0	31.6	67.0	4.0	-	1.0	16.0	21.0	6.5
	5	6.5	73.3	43.3	53.0	3.5	0.5	1.5	15.5	21.0	6.5
	6	6.5	58.3	33.3	64.0	3.0	-	1.0	12.0	16.0	6.5
	7	6.5	80.0	41.6	53.0	4.5	-	0.5	12.5	17.5	6.5
	8	6.5	71.6	25.0	71.0	4.0	-	0.5	8.0	12.5	6.5
	9	6.5	70.0	30.0	70.0	3.0	-	-	13.0	16.0	6.0
	10	6.5	78.3	40.0	60.0	2.0	-	1.5	15.5	19.0	6.5
N=10 X ± Sx	6.45±0.05	68.15±2.95	39.14±3.14	56.40±4.93	4.15±0.59	0.35±0.21	1.05±0.18	15.65±2.16	21.20±2.78	6.45±0.05	
N=20 X ± Sx	6.48±0.02	60.89±2.66	39.98±1.77	52.00±2.87	4.22±0.43	0.45±0.14	3.00±0.76	14.07±1.18	21.75±1.62	6.48±0.02	

* : Akrozom dışındaki

Çizelge 3: Laiciphos Sulandırıcısı İçin Sulandırma ve Çözüm Sonu Spermatojik Muayene Bulguları

Ejekülat No	SULANDIRMA SONU				ÇÖZÜM SONU						
	PH	Motilite (%)	Motilite (%)	Ölü Sp Oranı (%)	Anormal Spermatozoa Oranı (%)					PH	
					Baş*	Akrozom	Orta	Kuyruk	Toplam		
1 No'lu Boğa	1	6.0	60.0	31.6	57.0	3.0	0.5	2.0	15.0	20.5	6.0
	2	6.0	61.6	41.6	58.0	4.0	1.0	3.5	16.0	24.5	6.0
	3	6.0	55.0	55.0	34.0	2.0	-	0.5	14.5	17.0	6.0
	4	6.0	68.3	40.0	32.0	7.5	0.5	5.5	14.5	28.0	6.0
	5	6.5	66.6	51.6	41.0	3.0	-	8.5	18.0	29.5	6.0
	6	6.5	53.3	41.6	38.0	2.5	0.5	5.5	10.5	19.0	6.5
	7	6.5	65.0	55.0	43.0	2.5	1.0	4.0	18.5	26.0	6.0
	8	6.5	56.6	45.0	35.0	6.0	-	2.0	14.5	22.5	6.0
	9	6.5	65.0	45.0	46.0	3.5	1.0	4.5	20.0	29.0	6.5
	10	6.5	58.3	43.3	36.0	4.0	-	1.5	30.5	36.0	6.5
N=10 X ± Sx	6.30±0.08	60.97±1.63	44.97±2.30	42.00±2.91	3.80±0.54	0.45±0.13	3.75±0.75	17.20±1.70	25.20±1.81	6.15±0.07	
2 No'lu Boğa	1	6.5	61.6	55.0	43.0	4.5	-	2.0	12.5	19.0	6.0
	2	6.0	70.0	60.0	21.0	3.0	0.5	2.0	43.5	49.0	6.0
	3	6.0	65.0	50.0	50.0	0.5	-	1.5	33.5	35.5	6.0
	4	6.0	53.3	43.3	53.0	2.0	0.5	0.5	5.0	8.0	6.0
	5	6.0	71.6	46.6	35.0	2.0	1.0	2.0	17.0	22.0	6.0
	6	6.0	66.6	41.6	51.0	7.5	-	0.5	9.0	17.0	6.0
	7	6.0	70.0	30.0	63.0	6.5	-	3.5	15.0	25.0	6.0
	8	6.0	65.0	26.6	69.0	1.5	-	-	17.5	19.0	6.0
	9	6.0	66.6	30.0	69.0	2.5	1.5	1.0	13.5	18.5	6.0
	10	6.5	66.6	40.0	46.0	3.0	-	1.0	4.5	8.5	6.0
N=10 X ± Sx	6.10±0.06	65.63±1.65	42.31±3.51	50.00±4.75	3.30±0.70	0.35±0.16	1.40±0.32	17.10±3.91	22.15±3.88	6.00±0.00	
N=20 X ± Sx	6.20±0.05	63.30±1.25	43.64±2.06	46.00±2.86	3.55±0.43	0.40±0.10	2.57±0.48	17.15±2.07	23.68±2.11	6.08±0.04	

* : Akrozom dışındaki

Çizelge 4: Sitrata Sulandırıcısı İçin Sulandırma ve Çözüm Sonu Spermatozojik Muayene Bulguları

Ejekülat No	SULANDIRMA SONU		ÇÖZÜM SONU								
	pH	Motilite (%)	Motilite (%)	Ölü Sp Oranı (%)	Anormal Spermatozoa Oranı (%)					PH	
					Baş*	Akrozom	Orta	Kuyruk	Toplam		
1 No'lu Boğa	1	6.5	36.6	16.6	74.0	3.5	0.5	-	19.0	23.0	6.5
	2	6.5	43.3	25.0	62.0	6.5	2.0	7.0	8.0	23.5	6.5
	3	6.5	40.0	23.3	68.0	2.5	-	1.0	6.0	9.5	6.5
	4	6.5	35.0	26.6	61.0	9.5	0.5	8.5	16.5	35.0	6.5
	5	6.5	38.3	25.0	61.0	2.5	-	6.5	14.5	23.5	6.5
	6	6.5	43.3	26.6	62.0	3.0	-	7.5	11.0	21.5	6.5
	7	6.5	55.0	35.0	42.0	4.5	2.0	7.5	12.5	26.5	6.5
	8	6.5	46.6	20.0	67.0	4.5	-	-	11.0	15.5	6.5
	9	6.5	35.0	35.0	61.0	0.5	0.5	6.0	11.0	18.0	6.5
	10	6.5	48.3	33.3	48.0	4.5	0.5	4.0	13.5	22.5	6.5
N=10 X ± Sx	6.50±0.00	42.14±2.05	26.64±1.96	60.60±2.95	4.15±0.78	0.60±0.24	4.80±1.05	12.30±1.21	22.00±2.15	6.50±0.00	
2 No'lu Boğa	1	6.5	48.3	35.0	59.0	4.0	0.5	1.5	7.0	13.0	6.5
	2	6.5	65.0	45.0	32.0	4.5	1.0	0.5	21.0	27.0	6.5
	3	6.5	58.3	38.3	60.0	4.0	-	2.0	15.0	21.0	6.5
	4	6.5	43.3	35.0	60.0	3.5	0.5	2.5	16.0	22.5	6.5
	5	6.5	51.6	31.6	62.0	2.0	1.5	2.0	15.5	21.0	6.5
	6	6.5	38.3	13.3	81.0	5.0	-	-	13.5	18.5	6.5
	7	6.5	31.6	26.6	65.0	4.5	2.0	1.0	22.5	30.0	6.5
	8	6.5	53.3	18.3	77.0	0.5	-	-	17.5	18.0	6.5
	9	6.5	53.3	23.3	78.0	2.0	0.5	2.0	19.5	24.0	6.5
	10	6.5	50.0	31.6	68.0	3.5	-	0.5	18.5	22.5	6.5
N=10 X ± Sx	6.50±0.00	49.30±3.05	29.80±3.02	64.20±4.42	3.35±0.44	0.60±0.22	1.20±0.29	16.60±1.39	21.75±1.51	6.50±0.00	
N=20 X ± Sx	6.50±0.00	45.72±1.97	28.22±1.79	62.40±2.62	3.75±0.44	0.60±0.16	3.00±0.67	14.45±1.02	21.87±1.28	6.50±0.00	

• : Akrozom dışındaki

Çizelge 5: Tris Sulandırıcısı İçin Sulandırma ve Çözüm Sonu Spermatozojik Muayene Bulguları

Ejekülat No	SULANDIRMA SONU		ÇÖZÜM SONU								
	pH	Motilite (%)	Motilite (%)	Ölü Sp Oranı (%)	Anormal Spermatozoa Oranı (%)					PH	
					Baş*	Akrozom	Orta	Kuyruk	Toplam		
1 No'lu Boğa	1	6.5	68.3	45.0	35.0	4.0	1.0	0.5	13.0	18.5	6.5
	2	6.5	53.3	50.0	46.0	5.0	0.5	2.0	12.5	20	6.5
	3	6.5	56.6	50.0	35.0	1.5	-	1.5	8.0	11.0	6.5
	4	6.5	50.0	45.0	34.0	6.5	-	7.5	13.0	27.0	6.5
	5	6.5	51.6	48.3	35.0	3.5	-	6.5	14.0	24.0	6.5
	6	6.5	55.0	36.6	58.0	2.0	-	10.0	15.0	27.0	6.5
	7	6.5	63.3	45.0	37.0	5.0	0.5	8.0	16.5	30.0	6.5
	8	6.5	43.3	33.3	63.0	3.5	0.5	1.0	10.0	15.0	6.5
	9	6.5	60.0	48.3	41.0	3.5	0.5	5.5	15.5	25.0	6.5
	10	6.5	46.6	40.0	39.0	3.5	-	0.5	12.0	16.0	6.5
N=10 X ± Sx	6.50±0.00	54.80±2.40	44.15±1.82	42.30±3.26	3.80±0.46	0.30±0.11	4.30±1.13	12.95±0.80	21.35±1.96	6.50±0.00	
2 No'lu Boğa	1	6.5	73.3	53.3	44.0	4.0	-	1.0	11.5	16.5	6.5
	2	6.5	75.0	68.3	23.0	4.0	4.0	1.0	36.0	45.0	6.5
	3	6.0	58.3	50.0	45.0	3.0	2.0	8.5	16.5	30.0	6.5
	4	6.5	48.3	36.6	62.0	4.0	-	5.0	17.5	26.5	6.5
	5	7.0	70.0	48.3	45.0	2.0	-	1.5	16.0	19.5	6.5
	6	6.5	31.6	13.3	83.0	5.5	-	0.5	13.0	19.0	6.5
	7	6.5	63.3	38.3	57.0	5.5	1.0	1.5	13.5	21.5	6.5
	8	6.5	66.6	23.3	72.0	1.0	-	-	15.5	16.5	6.5
	9	6.5	68.3	21.6	76.0	4.0	-	0.5	9.5	14.0	6.5
	10	6.5	76.6	43.3	57.0	2.0	1.0	-	15.0	18.0	6.5
N=10 X ± Sx	6.50±0.07	63.13±4.41	39.63±5.27	56.40±5.67	3.50±0.47	0.80±0.41	1.95±0.85	16.40±2.31	22.65±2.92	6.50±0.00	
N=20 X ± S	6.50±0.03	58.96±2.62	41.89±2.76	49.35±3.57	3.65±0.32	0.55±0.20	3.12±0.74	14.68±1.25	22.00±1.72	6.50±0.00	

Çizelge 6: Biociphos, Laiciphos, Sitrat ve Tris Sulandırıcılarının Sulandırma Sonrası Spermatojik Bulgular Yönünden Karşılaştırılması (n=20)

	Biociphos X±sx	Laiciphos X±sx	Sitrat X±sx	Tris X±sx	Ö.D.
Motilite (%)	60.89±2.66 ^a	63.30±1.25 ^a	45.72±1.97 ^b	58.96±2.62 ^a	**
PH	6.48±0.02 ^a	6.20±0.05 ^b	6.50±0.00 ^a	6.50±0.03 ^a	**

** : p<0.01 (Farklı harfleri taşıyan aynı satırdaki grup ortalamaları arası farklar önemlidir).
Ö.D.: Önemlilik Derecesi.

Çizelge 7: Biociphos, Laiciphos, Sitrat ve Tris Sulandırıcılarının Çözüm Sonrası Spermatojik Bulgular Yönünden Karşılaştırılması (n=20)

	Biociphos X±sx	Laiciphos X±sx	Sitrat X±sx	Tris X±sx	Ö.D.
Motilite (%)	39.98±1.77 ^a	43.60±2.06 ^a	28.22±1.79 ^b	41.89±2.76 ^a	**
Ölü (%)	52.00±2.87 ^b	46.00±2.86 ^a	62.40±2.62 ^c	49.35±3.57 ^{ab}	**
pH	6.48±0.02 ^a	6.08±0.04 ^b	6.50±0.00 ^a	6.50±0.00 ^a	**
Anormal (%)					
Baş***	4.22±0.43	3.55±0.43	3.75±0.44	3.65±0.32	-
Akrozom	0.45±0.14	0.40±0.10	0.60±0.16	0.55±0.20	-
Orta	3.00±0.76	2.57±0.48	3.00±0.67	3.12±0.74	-
Kuyruk	14.07±1.18 ^a	17.15±2.07 ^b	14.45±1.02 ^{ab}	14.68±1.25 ^a	*
Toplam	21.75±1.62	23.68±2.11	21.87±1.28	22.00±1.72	-

** : p<0.01 (Farklı harfleri taşıyan aynı satırdaki grup ortalamaları arası farklar önemlidir).
* : p<0.05 (Farklı harfleri taşıyan aynı satırdaki grup ortalamaları arası farklar önemlidir).
- : p>0.05 (Grup ortalamaları arası fark önemli değildir).
Ö.D.: Önemlilik Derecesi.
*** : Akrozom dışındaki

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada kullanılan Holstein boğalardan sperma örnekleri haftada iki gün birer defa sun'i vajen yöntemiyle alınmış ve spermatolojik özellikler (sperma miktarı, spermatozoa yoğunluğu, spermatozoa motilitesi, ölü spermatozoa oranı, pH değeri ve anormal spermatozoa oranı) belirlenmiştir. Uygulanan sperma alma yöntemi ve sıklığının spermatolojik özellikler üzerine olumsuz bir etkisi gözlenmemiş, elde edilen ortalama sonuçlar normal sınırlar içinde kalmıştır (1,9,13,14,15,18,23,30).

Bu çalışmada Biociphos, Laiciphos, Sitrata ve Tris sulandırıcıları ile sulandırılan spermada sulandırma sonrası spermatozoa motilitesi (%) ve pH değerleri sırasıyla 60.89 ± 2.66 ve 6.48 ± 0.02 ; 63.30 ± 1.25 ve 6.20 ± 0.05 ; 45.72 ± 1.97 ve 6.50 ± 0.00 ; 58.96 ± 2.62 ve 6.50 ± 0.03 olarak tespit edilmiştir. Sulandırıcılar arasında yapılan istatistiki değerlendirmede ise, motilite yönünden Sitrata ($p < 0.01$), pH yönünden Laiciphos ($p < 0.01$) hariç grup ortalamaları arası farklar önemli bulunmamıştır. Sulandırılmış spermanın nativ spermaya göre sulandırma sonrası motil spermatozoa kaybı ise Biociphos için % 19.08; Laiciphos için % 15.88; Sitrata için % 39.24 ve Tris için % 21.64 olarak saptanmıştır. Bu durumda spermanın sulandırılması sonucunda en düşük motilite kaybı Laiciphos sulandırıcısında, en yüksek motilite kaybı ise Sitrata sulandırıcısında tespit edilmiştir. Diğer sulandırıcılara oranla Laiciphos sulandırıcı-

sında tespit edilen daha az motilite kaybının boğa X sulandırıcı veya boğa X sulandırıcı X pH ilişkisine özgü olabilir.

Foulkes (10) % 2.9 sodyum sitrata, % 20 yumurta sarısı ve % 7 gliserol içeren sulandırıcıda (pH; 7.0) boğa spermatozoasını azot gazı ile 0.25 ml payette dondurmuş ve motilite oranlarını sulandırma sonrası % 47.9; çözümü sonrası % 28.4 olarak saptamıştır. Bu çalışmada ise farklı pH (6.5) değerine rağmen aynı sulandırıcı ile sulandırma (% 45.72) ve çözümü sonrası (% 28.22) benzer motilite neticeleri elde edilmiştir.

Boğa spermasını % 2.2 sitrata, % 20 yumurta sarısı ve % 7 gliserol ile 20×10^6 /ml motil spermatozoa bulunacak şekilde azot gazı ile yıkanmış cam ampüllerde donduran Roussel ve ark. (26) yaptıkları birinci çalışmada (5 boğa) başlangıç, dondurma öncesi ve çözümü (5°C) sonrası ortalama motiliteyi sırasıyla % 53, 52, 45; ikinci çalışmada (6 boğa) ise, % 49, 49 ve 45 olarak tespit etmişlerdir. Bu araştırmacıların sulandırma sonrası tespit ettiği motilite sonuçları yapılan çalışmada elde edilen neticelere yakın olduğu halde, çözümü sonrası tespit edilen bulguların kullanılan metot, pH (6.9), paketleme ve çözümü farklılığı nedeniyle daha yüksek çıktığı öngörülmektedir.

Davis ve ark. (6) 20 boğadan alınan spermayı % 7 gliserol içeren farklı oranlardaki (0.25, 0.20, 0.15 ve 0.10 M) tris ve sodyum sitrata (2.9 g.) ile sulandırmışlar ve sulandırma ve dondurma (kuru buz-alkol banyosu, 1.5 ml

ampülde(-79°C) sonrası motilite oranlarını incelemiştir. Sulandırma sonrası (5°C) tris (0.20 M) için başlangıç motilitesi % 62, farklı tris oranlarına göre sırasıyla ilk gün motilite % 59, 58, 52 ve 40 olurken; sitrat için sulandırma sonrası başlangıç motilitesi % 62, ilk gün motilitesi ise % 56 olmuştur. Dondurma sonrası -85°C'da muhafaza edilen farklı oranlardaki tris ve sitrat sulandırıcılarının çözümü (40°C) sonrası motiliteleri ise sırasıyla % 53, 52, 38, 23 ve 49 olarak saptanmıştır.

Yürütülen çalışmada ise, 0.20 M (2.42g./100ml) tris ile sulandırma sonrası (5°C) Davis ve ark. (6) nın saptadığı neticelere çok benzer motilite (% 58.96) elde edilirken, çözümü sonrası (35°C/12s.) daha düşük motilite (% 41.89) tespit edilmiştir. Buna karşılık bu çalışmada kullanılan sitrat (2.32g./100ml) sulandırıcısı ile gerek sulandırma gerekse çözümü sonrası bu araştırmacıların ortaya koyduğu sonuçlara göre daha düşük motilite sağlanmıştır. Tris ve sitrat sulandırıcıları ile özellikle çözümü sonrası elde edilen farklı sonuçların her iki araştırmada uygulanan değişik dondurma ve paketleme metodlarından ve farklı boğaların bu sulandırıcılara ve dondurma metodlarına verdiği cevaptan olabilir.

Yassen ve Foote (33) boğa spermasını % 1 yumurta sarısı ve % 7 gliserol içeren 0.20 M tris sulandırıcısı ve 2.9 g sodyum sitrat sulandırıcısında dondurmuş (kuru buz-alkol banyosu/ampül) ve tris sulandırıcısı ile donma öncesi (5°C) % 54, çözümü sonrası % 30 motilite tespit etmiştir. Aynı araştırmada % 1

yumurta sarısı içeren sodyum sitrat sulandırıcısında donma öncesi (5°C) ve çözümü sonrası motil spermatozoa oranları sırasıyla % 58 ve 28; buna karşın % 20 yumurta sarısı ihtiva eden sitrat sulandırıcısında ise, % 56 ve 31 olarak gerçekleşmiştir.

Yürütülen araştırmada % 20 yumurta sarısı ihtiva eden 0.20 M tris sulandırıcısı ile sulandırma (% 58.96) ve özellikle donma sonrası (% 41.89) daha yüksek motilite tespit edilmiştir. Aynı şekilde Davis ve ark. (6) nın % 20 yumurta sarısı içeren 0.20 M tris sulandırıcısı ve benzer dondurma metodu ile elde ettiği daha yüksek motiliteye rağmen, bu araştırmacıların saptadığı daha düşük sonuçların, farklı yumurta sarısı (% 1) ve dondurma oranları ile boğa X sulandırıcı faktörü nedeniyle ortaya çıktığı varsayılmaktadır. Ancak % 20 yumurta sarısı içeren sitrat sulandırıcısı ile tespit edilen çözümü sonrası düşük motilite, boğa X sulandırıcı faktörünün spermatozoa motilitesini etkileyen başlıca etkenlerden biri olduğunu ortaya koymaktadır.

Steinbach ve Foote (29) 10 boğa spermasını farklı tris (0.15, 0.20, 0.25, 0.30 ve 0.35 M) ve sitrik asit konsantrasyonları ile değişik pH (6.0, 6.5, 7.0 ve 7.5) ve gliserol (% 6.4 ve 8.8) seviyelerinde dondurmuşlardır. Bu araştırmacılar ilk çalışmada, 0.20 M tris, % 6.4 gliserol, 6.5 pH ve 3 saat ekilibrasyon ile donma öncesi % 49 motilite; ikinci çalışmada ise, aynı oranlardaki sulandırıcılar ve 1.5 saat ekilibrasyon süresi ile çözümü sonrası % 43 motil spermatozoa saptamışlardır. Bu

çalışmada ise, farklı dondurma oranlarına rağmen aynı değerdeki pH (6.5) ve tris sulandırıcısı ile sulandırma sonrası daha yüksek, çözüm sonrası ise benzer motilite saptanmıştır.

Bu araştırmada Biociphos, Laiciphos, Sitrat ve Tris sulandırıcıları ile dondurulan spermanın çözüm sonrası motilite (%), ölü spermatozoa oranı (%), pH değeri ve anormal spermatozoa oranı (%) sırasıyla Biociphos sulandırıcısı için 39.98 ± 1.77 , 52.00 ± 2.87 , 6.48 ± 0.02 , 21.75 ± 1.62 ; Laiciphos sulandırıcısı için 43.60 ± 2.06 , 46.00 ± 2.86 , 6.08 ± 0.04 , 23.68 ± 2.11 ; Sitrat sulandırıcısı için 28.22 ± 1.79 , 62.40 ± 2.62 , 6.50 ± 0.00 , 21.87 ± 1.28 ; Tris sulandırıcısı için 41.89 ± 2.76 , 49.35 ± 3.57 , 6.50 ± 0.00 , 22.00 ± 1.72 olarak saptanmıştır. Buna göre, çözüm sonrası sitrat sulandırıcısı ($p < 0.01$) hariç, biociphos, laiciphos ve tris sulandırıcıları arasında motilite yönünden önemli bir fark olmadığı halde, laiciphos sulandırıcısında pH'ın diğer sulandırıcılardan önemli derecede ($p < 0.01$) farklı olduğu tespit edilmiştir. Ölü spermatozoa oranı yönünden ise, sitrat sulandırıcısı ile diğer sulandırıcılar arasında ve biociphos ile laiciphos sulandırıcısı arasında önemli derecede ($p < 0.01$) fark saptanmıştır. Kullanılan tüm sulandırıcılarda anormal spermatozoa oranları normal sınırlar içinde bulunmuş, ancak laiciphos ile biociphos ve laiciphos ile tris sulandırıcıları arasında anormal kuyruk oranları bakımından önemli derecede ($p < 0.05$) fark tespit edilmiştir. Laiciphos ile diğer sulandırıcılar arasında ortaya çıkan bu farkın,

çözüm sonrası tespit edilen düşük pH (6.08), ozmotik basınç veya sulandırıcı elamanlarındaki farklılıktan mı kaynaklandığı bilinmemektedir.

Biociphos, Laiciphos, Sitrat ve Tris sulandırıcıları ile dondurulan spermada sulandırma ve çözüm sonrası dönemler arasındaki motil spermatozoa zayıf oranı sırasıyla % 34.34, 31.05, 38.27 ve 28.95 olarak saptanmıştır. Araştırma sonucuna göre çözüm sonrası en yüksek motilite laiciphos sulandırıcısında, en düşük motil spermatozoa kaybı ise tris sulandırıcısında görülmüştür. Çözüm sonrası ölü spermatozoa oranı (%) ve motil spermatozoa kaybı (%) dikkate alındığında tris ve laiciphos sulandırıcılarının donma ve çözülme stresine karşı spermatozoayı diğer sulandırıcılara oranla daha iyi koruduğu söylenebilir. Ancak laiciphos sulandırıcısı sulandırma sonrası en az motil spermatozoa kaybına yol açtığı halde, donma-çözüm sonrası bu konudaki üstünlüğünü kaybetmesi çözüm sonrası tespit edilen düşük pH (6.08) bağlı olabilir. Bu duruma neden olan faktörlerin daha net belirlenmesi için başka tetkiklerin yapılması yerinde olur.

Hinsch ve ark. (16) başlangıç motilitesi % 91.4 olan sulandırılmış Holstein boğa spermalarında Biociphos ve Triladyl sulandırıcıları ile çözüm sonrası sırasıyla % 60 ve 61 motilite sağlarken, Bohm ve ark. (3) Biociphos ve Tris ile çözüm sonu benzer neticeler (sırasıyla % 60 ve 62) tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada ise, Biociphos ve Tris ile daha düşük motilite (sırasıyla %

39.98 ve 41.89) saptandığı halde, Biociphos sulandırıcısı için (başlangıç motilite % 60.89) bu araştırmalarda olduğu gibi sulandırma ve çözüm sonrası dönemler arasındaki motil spermatozoa zayıf oranı % 34 olmuştur. Woelder ve Malva (32) boğa spermasının dondurma ve çözündürme işlemleri esnasında motil spermatozoa oranında takriben % 50-60 eksilme meydana geldiğini bildirmiştir.

Coulter ve Foote (4) Holstein boğaların spermasını % 7 gliserol kapsayan yumurta sarısı-sitrat ve promine D-tris-sitrik asit ile klasik yöntemlerle sulandırmış (50×10^6 sp./ml) ve 1.0 ml cam ampül ve 0.5 ml plastik payetlerde dondurmuştur. Bu sulandırıcılardaki spermatozoanın çözüm sonu ortalama motilitesini, sırasıyla % 40.7 ve 37.4; her iki sulandırıcının da kullanıldığı ampül ve payet ile muhafaza yöntemine göre de, sırasıyla % 38.8 ve 39.3 olarak belirlemiştir.

Yürütülen araştırmada kullanılan farklı hacim ve paketleme (0.25 ml payet) yöntemine rağmen, promine-D ihtiva eden biociphos sulandırıcısı ile çözüm sonrası biraz daha yüksek motilite (% 39.98) elde edilirken, sitrat sulandırıcısı ile çok daha düşük motilite (% 28.22) saptanmıştır. Sadece biociphos sulandırıcısının motilite neticeleri dikkate alındığında 0.25 ve 0.5 ml plastik payet ile muhafaza yöntemleri arasında önemli bir fark tespit edilememiştir.

Spermatozoada az hasar oluşturan derin dondurma tekniği geliştirmek için Rostel (25) Laiciphos A ve B ile sulandırdığı boğa spermasını payet içinde alkol-kuru buz ve azot

buharı kullanarak dondurmuş ve çözüm sonrası en yüksek motiliteyi alkol+kuru buzda % 65, azot buharında ise % 60 olarak saptamıştır. Dimitropoulos (8) ise 2 boğanın spermasını Laiciphos plus 470 ve D. 36 sulandırıcıları ile dondurmuş ve çözüm sonrası motiliteyi sırasıyla % 26.3 ve 31.5 olarak bildirmiştir. Laiciphos 488 sulandırıcısı ile yürütülen bu araştırmada (% 43.60) ise, birinci çalışmadan daha düşük, ikinci çalışmadan ise daha yüksek motilite elde edilmiştir. Bu durum çözüm sonu motilitesi üzerine uygulanan metodun farklılığından ziyade boğa faktörünün önemli rol oynadığını göstermektedir.

Steinbach ve Foote (28) 6 boğanın sperma örneklerini sitrat-yumurta sarısı-gliserol ve tris-yumurta sarısı-gliserol-fruktoz sulandırıcıları ile 6 saat ekilibasyonu takiben azot gazında; 5°C/-15°C arasındaki kritik aralıkta 8°C/d., -15°C/-40°C arasında 5°C/d., -40°C/-130°C arasında ise 10°C/d. dondurma oranları ile 1 ml ampülde dondurmuştur. % 7.2 ve 8.8 gliserol oranları kullanılan sitrat ve tris sulandırıcılarında çözüm sonu motilite sırasıyla % 31 ve 36 olarak tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada ise, farklı gliserol ve dondurma oranlarına rağmen sitrat (% 28.22) ve tris (% 41.89) sulandırıcıları ile benzer neticeler sağlanmıştır.

Maliyetleri çok daha fazla olmasına rağmen Laiciphos ve Biociphos gibi hazır sulandırıcıların spermanın sulandırma işleminde sağladıkları kolaylık bir avantaj olabilir. Aynı zamanda sperma sulandırıcılarında kullanılan yumurta sarısı ve süt gibi hayvansal

kökenli cryoprotektanların enfeksiyon riski oluşturmaları ve spermadaki proteinlerin biyokimyasal analizlerini yanıltabilmeleri bitkisel protein içeren sulandırıcılar için bir üstünlük oluşturabilir.

Sonuç olarak, elde edilen neticelere göre sitrat hariç bu çalışmada kullanılan sulandırıcı-ların birbirlerine büyük bir üstünlük sağlama-dıkları, ancak sırasıyla Laiciphos, Tris ve Biociphos sulandırıcılarının boğa spermasının dondurulmasında daha uygun ve kullanılabilir olduğu gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, Parkinson TJ** (1996) *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. p.: 621-654.
2. **Blackshaw AW, Salisbury GW** (1957) *Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention*. Journal of Dairy Science, 40: 1099-1106.
3. **Bohm JG, Muller-Schlosser F, Hinsch E, Ponce AA, Schill WB, Hinsch K D** (1995) *Comparison of different extenders for cryopreservation of bull sperm*. Journal of Reproduction and Fertility, Abst.,No:16, 1995.
4. **Coulter GH, Foote RH** (1977) *Effects of package, extender, and light on stored frozen bull spermatozoa*. Journal of Dairy Science, 60: 1428-1432.
5. **Davis S, Bratton RW, Foote RH** (1963) *Livability of bovine spermatozoa at 5, -25, and -85°C in tris-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders*. Journal of Dairy Science, 46: 333-336.
6. **De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ** (1993) *Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing*. Cryobiology, 30: 32-44.
7. **Dimitropoulos E** (1975) *Valeur comparative "in vitro" et "in vivo" de deux dilueurs du sperme de taureau: le laiciphos plus 470 et le D.36. Annales De Medecine Veterinaire, 119: 167-180.*
8. **Dukelow RW, Frederick EC, Graham EF** (1960) *Frequency of ejaculation in the bovine*. Journal of Dairy Science, 2: 1335-1339.
9. **Foulkes JA** (1977) *The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa*. Journal of Reproduction and Fertility, 49: 277-284.
10. **Foulkes JA, Stewart DL** (1977) *Fertility of dairy cattle after artificial insemination with semen frozen in a lipoprotein diluent*. Journal of Reproduction and Fertility, 51: 175-177.
11. **Gebauer MR, Pickett BW, Komarek RJ, Gaunya WS** (1970) *Motility of bovine spermatozoa extended in "defined" diluents*. Journal of Dairy Science, 53: 817-823.
12. **Hafez ESE** (1987) *Reproduction In Farm Animals..* Edit: Lea and Febiger Philadelphia-USA. p. 168-502.
13. **Hafs HD, Hoyt RS, Bratton RW** (1959) *Libido, sperm characteristics, sperm output, and fertility of mature dairy bulls ejaculated daily or weekly for thirty-two weeks*. Journal of Dairy Science, 42: 626-636.
14. **Herman HA, Mitchel J, Doak GA** (1994) *The Artificial Insemination and Embryo Transfer Of Dairy and Beef Cattle*. Eight Edit: Interstate Publishers, Inc., Danville, Illinois. p. 3-137.
15. **Hinsch E, Hinsch KD, Boehm JG, Schill WB, Schloesser FM** (1997) *Fuctional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders*. Reproduction of Domestic Animals, 32: 143-149.
16. **Kampschmidt RF, Mayer DT, Herman HA** (1953) *Lipit and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa*. Journal of Dairy Science, 36: 733-742.
17. **Klemm S** (1993) *Processing semen-quality control: Bovine Artificial Insemination Technical Manual*, p.59-69. Edit: P. Penner. 2nd Ed. Reproduction Technology Semex Canada Guelph, Ontario, Canada.
18. **Lanz RN, Pickett BW, Komarek RJ** (1965) *Effect of lipit additives on pre- and post-freeze survival of bovine spermatozoa*. Journal of Dairy Science, 48: 12: 1692-1697.

19. **O'Shea T, Wales RG** (1964) *Effects of potassium on ram spermatozoa during chilling to and storage at 5°C*. Journal of Reproduction and Fertility, 8: 121-132.
20. **Pace MM, Graham EF** (1974) *Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing*. Journal of Animal Science, 39: 6: 1144-1149.
21. **Pace MM, Sullivan JJ, Elliot FI, Graham EF, Coulter GH** (1981) *Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0,5 ml French straws*. Journal of Animal Science, 53: 3: 693-701.
22. **Peters AR, Ball PJH** (1995) *Reproduction In Cattle*. 2nd Edit: Blackwell Sci. Ltd. p. 62-88.
23. **Robbins RK, Saacke RG, Chandler PT** (1976) *Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws*. Journal of Animal Science, 42: 1: 145-154.
24. **Rostel W** (1977) *A new, Less damaging technique for deep freezing semen: Tierärztliche-Umschau, [record-VETCD]*, 32: 9: 456-458.
25. **Roussel JD, Patrick TE, Kellgren HC** (1962) *Effects of nitrogen and carbon dioxide on livability and fertility of frozen bovine spermatozoa*. Journal of Dairy Science, 46: 527-532.
26. **Saacke RJ** (1993) *What happens when a sperm is frozen and thawed: Bovine Artificial Insemination Technical Manual*, p. 65-70. Edit: Penner P. Reproduction Technology Semex Canada Guelph, Ontario. Canada.
27. **Steinbach J, Foote RH** (1964) *Post-thaw survival of bovine spermatozoa frozen by different methods in buffered-yolk and skimmilk extenders*. Journal of Dairy Science, 47: 909-915.
28. **Steinbach J, Foote RH** (1967) *Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa*. Journal of Dairy Science, 50: 205-213.
29. **Tekin N** (1994) *Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi: Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve Infertilite*, s. 69-79. Edit: E. Alaçam. 1. Baskı, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara.
30. **Unal MB, Berndtson WE, Pickett BW** (1978) *Influence of sugars with glycerol on post-thaw motility of bovine spermatozoa in straws*. Journal of Dairy Science, 61: 83-89.
31. **Woelders H, Malva AP** (1998) *How important is the cooling rate in cryopreservation of (bull) semen, and what is its relation to thawing rate and glycerol concentration*. Reproduction of Domestic Animals, 33: 299-305.
32. **Yassen AM, Foote RH** (1967a) *Freezability of bovine spermatozoa in tris-buffered yolk extenders containing different levels of tris, sodium, potassium and calcium ions*. Journal of Dairy Science, 50: 887-892.
33. **Yassen AM, Foote RH** (1967b) *Relationship of ion concentration to the critical temperatures during freezing of bull spermatozoa*. Journal of Dairy Science, 50: 893-895.