

Farklı Sulandırıcılarla Sulandırılan Koç Ejakülatlarında Değişik Katkı Maddelerinin Spermatojik Özellikler ve Canlı Kalma Süresi Üzerine Etkileri

Hazım GÖKÇEN*

M. Kemal SOYLU**

Hüseyin TÜMEN***

Bülent ILGAZ****

ÖZET

Bu çalışmada 4 ayrı sulandırıcı ile sulandırılan koç ejakülatlarına ilave edilen katkı maddelerinin kimi spermatojik özelliklere etkileri araştırıldı. Koçtan sun'i vajenle alınan ejakülatlar, Glukoz-fosfat, Tris, Sodyum sitrat ve Süt tozu sulandırıcıları ile sulandırıldıktan sonra split sample yöntemine göre 4 eşit parçaya bölündü. Her bölüme belirli miktarlarda sığır serum albumini, prostaglandin F_{2α} ve vitamin-E katılıp, sulandırılmış spermanın ısı 5°C'ye düşürüldü. Her ejakülat bölümünde 12 saat aralıklarla motilite, ölü spermatozoon ve anormal spermatozoon oranları saptandı. Sonuçta prostaglandin F_{2α} katılan ejakülat bölümlerinde, anılan spermatojik özellikler bakımından en iyi sonuçların alındığı gözlemlendi.

SUMMARY

Effects of Various Additives on The Spermatojical Properties and Survival Time of Ram Ejaculates Diluted with Different Diluents

In this study, the effects of some additives on the diluted ram ejaculates were investigated. The ejaculates, collected by means of artificial vagina, were diluted with Glucose-phosphate, Tris, Sodium citrat and milk powder and then divided

* Prof. Dr.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Bursa.

** Yard. Doç. Dr.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Bursa.

*** Araş. Gör.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Bursa.

**** Uzm. Vet. Hek. Dr.; Karacabey Tarım İşletmesi, Bursa.

into 4 equal parts by the split sample method. Certain amounts of bovine serum albumine, prostaglandin $F_{2\alpha}$ and vitamin-E were added into each part of ejaculates and cooled to 5°C. On each part of ejaculates, the motility and the rate of dead and abnormal spermatozoa were determined by 12 hours intervals. In conclusion, it was observed that the prostaglandin $F_{2\alpha}$ added ejaculate samples show the best spermatological properties.

Key words: Ram semen, diluents, additives, spermatological properties, survival time.

GİRİŞ

Türkiye'de koyunculüğün en önemli sorunu verim düşüklüğüdür. Bunun da nedeni koyunların büyük çoğunluğunun düşük verimli ırklardan oluşmasıdır. Koyunların başta dölverimi olmak üzere verimlerinin artırılmasında en etkin yöntem melezlemedir. Melezlemede ise gerek üstün verimli koçlardan daha etkin ve yaygın olarak yararlanmak, gerekse kültür ırkı koçların yağlı kuyruklu yerli koyunları tabii olarak aşamaması bakımından sun'i tohumlama kaçınılmaz bir yöntemdir.

Ülkemizde yerli ırkların, üstün verimli kültür ırklarına dönüştürülmesi amacıyla 40 yıldır kesintisiz olarak uygulanagelen sun'i tohumlama çalışmalarından maalesef istenilen sonuçlar alınamamıştır. Bununda nedeni kullanılan yöntemin yetersizliğine bağlanabilir. Koyun sun'i tohumlamasında başlangıçtan beri taze sperma kullanılmaktadır. Sun'i vajen ile koçlardan alınan sperma hiçbir işleme tabi tutulmadan koyunlara verilmektedir. Bu durumda, spermadan, hemen kullanıma zorunluluğu nedeniyle yeterince yararlanılamamaktadır. Oysa ki, başka ülkelerde uygulandığı biçimde sperma sulandırılıp ısısı + 5°C ye düşürüldükten sonra belirli süre saklanıp tohumlamada kullanılsa hem bir ejakülden daha fazla koyun tohumlanmış olacak, hem de spermadan daha uzun süre yararlanma olanağı doğacaktır. Böylece koyun sun'i tohumlaması daha pratik ve ekonomik hale dönüştürülebilir. Nitekim, bu konuda yapılan gerek deneysel gerekse alan çalışmalarından oldukça iyi dölverimi sonuçları alındığı bildirilmektedir^{1,2,3,4}.

Bu çalışmamızda yeniden yapılmasına gereksinim duyulan koyun sun'i tohumlama organizasyonunun bilimsel alt yapısına katkıda bulunmak amacıyla çeşitli sulandırıcılarla birlikte kullanılan kimi maddelerin koç spermasının spermatolojik özellikleriyle canlı kalma süresi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Araştırmada materyal olarak Karacabey Tarım İşletmesi'nde yetiştirilen bir adet Merinos koçundan elde edilen ejakülatlar kullanıldı. İşletmenin normal bakım ve besleme koşullarında bulundurulmuş damızlık materyal arasından spermatolojik özelliklerine bakılarak seçilen koçtan spermalar sun'i vajenle alındı.

Spermalar gerekli muayene ve değerlendirmeler yapıldıktan sonra aşağıda bileşimleri verilen sulandırıcılarla 1:1 oranında ayrı ayrı sulandırıldı.

1. *Glukoz-fosfat*

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	: 0.154 gr.
KH ₂ PO ₄	: 0.032 gr.
Glukoz	: 0.600 gr.
Yumurta sarısı	: 2 cc.
Bidistile su	: 8 cc.

2. *Sodyum sitrat*

Sodyum sitrat dihidrat	: 0.29 gr.
Yumurta sarısı	: 2 cc.
Bidistile su	: 8 cc.

3. *Tris*

Tris	: 0.2422 gr.
Sitrik asit	: 0.1342 gr.
Fruktoz	: 0.1000 gr.
Yumurta sarısı	: 2 cc.
Bidistile su	: 8 cc.

4. *Süt tozu*

Süt tozu	: 1 gr.
Yumurta sarısı	: 2 cc.
Bidistile su	: 8 cc.

Anılan sulandırıcılarla sulandırılan ejakülatlar split sample yöntemiyle 4 eşit parçaya bölünerek her bölüme; Sığır serum albumini (% 3), Prostaglandin F_{2α} (600 µg/ml) ve Vitamin-E (25.5 mg/ml) katıldı. Sulandırılan ve katkı maddeleri ilave edilen ejakülat bölümlerinin ısı 5°C ye düşürüldükten sonra, ilki sulandırıldıktan 6 saat sonra, diğerleri de onu izleyen her 12 saatte bir olmak üzere spermatolojik muayeneleri yapıldı. Spermatolojik özelliklerden motilite sulandırılmış spermada bir yönde güçlü hareketli spermatozoonların yüzdesi olarak saptandı. Ölü spermatozoon oranı eosin-nigrosin, anormal spermatozoon oranı da çini mürekkebi ile boyanan preparatlarda tesbit edildi.

BULGULAR

Sığır serum albumini, prostaglandin F_{2α} ve vitamin-E içeren Glukoz-fosfat, Tris, Süt tozu ve Sodyum sitrat sulandırıcılarıyla sulandırılıp düşük ısıda saklanan spermanın, sulandırıldıktan sonra ve saklama sırasındaki muayenelerinden elde edilen motilite değerleri ile ölü ve anormal spermatozoon oranları Tablo I'de verilmiştir.

Tablo: I
Çeşitli Katkı Maddeleri İçeren Farklı Sulandırıcılarla Sulandırılıp Isısı
5°C ye Düşürülen Koç Spermasınının 12 Saat Arayla Saptanan Bazı
Spermatolojik Özellik Değerleri

Sulandırıcı	Sulandırdıktan sonra		6. Saat		8. Saat		30. Saat		42. Saat		54. Saat		66. Saat		78. Saat		90. Saat		102. Saat		114. Saat		126. Saat													
	Motilite	Ölü Spermatozoit	Anormal Spermatozoit	Motilite	Ölü Spermatozoit	Anormal Spermatozoit	Motilite	Ölü Spermatozoit	Anormal Spermatozoit	Motilite	Ölü Spermatozoit	Anormal Spermatozoit	Motilite	Ölü Spermatozoit	Anormal Spermatozoit	Motilite	Ölü Spermatozoit	Anormal Spermatozoit	Motilite	Ölü Spermatozoit	Anormal Spermatozoit	Motilite	Ölü Spermatozoit	Anormal Spermatozoit												
Glukoz-Fosfat Kontrol	80.0	7.2	1.5	75.0	12.9	1.5	65.0	12.9	1.5	65.0	22.2	1.8	50.0	24.0	2.1	40.0	39.9	1.5	20.0	49.8	1.8	10.0	54.0	2.1												
Glukoz-Fosfat Albumin	75.0	8.7	1.8	65.0	14.4	2.1	60.0	14.7	1.8	60.0	15.6	1.5	55.0	17.4	2.1	40.0	29.1	3.6	30.0	46.2	3.9	10.0	55.2	3.6												
Glukoz-Fosfat PGF _{2α}	80.0	9.0	2.1	65.0	11.7	2.1	60.0	12.9	2.1	60.0	13.5	1.8	50.0	17.4	2.7	45.0	26.7	1.8	35.0	35.7	1.8															
Glukoz-Fosfat Vitamin E	75.0	11.1	1.5	70.0	13.8	1.5	70.0	15.9	2.1	55.0	17.1	1.8	40.0	27.0	1.8	40.0	34.5	1.5	15.0	52.5	1.9															
Tris Kontrol	85.0	11.4	0.9	70.0	19.8	3.6	60.0	21.0	3.3	50.0	21.0	1.5	50.0	24.3	3.0	50.0	36.9	4.2	45.0	41.1	3.9	30.0	42.6	5.1	20.0	66.3	4.8	10.0	89.4	4.2	10.0	93.6	6.0	5.0	95.4	5.4
Tris Albumin	85.0	14.1	0.3	75.0	14.1	1.5	75.0	23.1	1.8	60.0	27.3	4.5	60.0	29.1	1.5	40.0	50.4	5.4	20.0	57.0	4.5	20.0	49.8	4.5	15.0	79.2	4.8	10.0	93.0	4.8	10.0	95.4	3.6	5.0	95.4	4.8
Tris PGF _{2α}	75.0	12.3	1.5	70.0	14.1	3.6	60.0	15.0	1.5	60.0	24.6	1.5	60.0	24.0	1.5	60.0	22.8	2.4	50.0	37.2	2.1	30.0	40.0	2.0	30.0	69.3	3.2	20.0	87.0	2.7	20.0	87.6	2.4	20.0	86.7	4.2
Tris Vitamin E	85.0	20.4	2.1	75.0	25.8	1.8	75.0	30.9	3.6	70.0	30.6	2.4	60.0	32.7	2.4	40.0	54.3	3.9	20.0	43.5	3.3	20.0	54.0	3.9	15.0	64.8	3.9	15.0	88.0	2.4	10.0	94.2	2.7	5.0	95.1	2.4
Süt tozu Kontrol	80.0	9.9	0.6	75.0	10.5	1.8	70.0	32.4	7.5	70.0	34.5	18.6	30.0	26.4	3.9	25.0	36.3	2.4	20.0	39.3	1.8	20.0	39.9	1.8	15.0	66.3	3.9									
Süt tozu Albumin	80.0	9.6	2.4	75.0	15.0	2.1	70.0	25.5	4.5	70.0	27.6	33.3	40.0	28.2	4.5	35.0	34.5	3.9	30.0	55.2	4.8	30.0	54.0	4.2	20.0	72.7	4.2	15.0	84.3	4.8						
Süt tozu PGF _{2α}	85.0	13.5	0.9	75.0	14.4	1.8	70.0	20.1	3.9	60.0	20.1	6.0	50.0	26.1	3.9	45.0	48.6	4.2	40.0	38.7	3.9	20.0	48.0	4.2	10.0	58.9	6.0									
Süt tozu Vitamin E	85.0	13.8	0.6	80.0	16.2	3.6	80.0	19.8	3.0	70.0	21.9	4.2	50.0	27.0	3.9	20.0	35.1	4.5	15.0	39.9	4.2	15.0	50.7	5.4	10.0	56.4	5.1	10.0	81.3	5.4						
Sodyum sitrat Kontrol	70.0	18.6	6.9	65.0	27.6	12.0	60.0	27.0	26.7	45.0	40.2	22.5	45.0	31.8	24.6	35.0	46.8	24.3	30.0	45.3	26.7	30.0	48.6	21.9	10.0	56.1	26.4									
Sodyum sitrat Albumin	65.0	15.6	2.7	60.0	22.5	8.3	60.0	24.6	8.1	50.0	24.9	8.1	30.0	24.0	8.4	15.0	50.0	8.1	10.0	53.0	12.0	10.0	69.0	15.6												
Sodyum sitrat PGF _{2α}	85.0	11.1	1.8	75.0	19.8	3.0	70.0	27.0	2.7	60.0	26.1	2.7	60.0	20.7	2.7	50.0	19.8	2.7	45.0	33.9	5.7	45.0	52.5	5.4	30.0	52.0	5.7									
Sodyum sitrat Vitamin E	70.0	15.3	2.4	65.0	18.6	3.0	60.0	24.0	3.3	60.0	24.3	4.2	55.0	25.8	3.9	45.0	30.6	4.2	40.0	38.1	3.9	40.0	72.3	7.7	20.0	65.0	5.4	10.0	88.5	7.5						
ORTALAMA	78.7	12.6	1.9	70.9	16.9	3.3	66.6	21.7	4.8	60.3	24.5	7.1	49.1	25.4	4.5	38.4	37.5	4.9	29.1	44.1	5.5	23.6	52.2	6.2	17.7	64.6	5.7	12.8	87.3	4.5	12.5	92.7	3.7	8.7	93.1	4.2

TARTIŞMA VE SONUÇ

Spermanın sulandırılmasından önce yapılan muayenesinde saptanan spermatolojik özelliklere ait değerler gerek klasik bilgiler gerekse literatür verileri ile uyumlu olarak normal sınırlar içerisinde bulunmuştur^{5,6}.

Spermanın anılan sulandırıcılar ile sulandırılmasından sonra sperma örneklerinde saptanan motilite, ölü spermatozoon ve anormal spermatozoon oranlarına ilişkin değerler birçok araştırmacının elde ettiği sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Nitekim Kumar et al.⁷ Tris ile sulandırılmış spermada motilite oranının % 87.0, canlı spermatozoon oranının da % 83.3 olduğunu, Petruzzi et al.⁸ da süttozu, yumurta sarısı-sodyum sitrat ve tris ile sulandırılmış sperma örneklerinde motilite oranını % 66.85; 69.11 ve 70.44 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

BSA katılan sperma bölümünde gerek sulandırma işleminden sonra, gerekse + 5°C de saklama süresince 12 saat aralıklarla yapılan muayenelerde gözlenen söz konusu spermatolojik özelliklere ilişkin bulgular kontrol grubunda elde edilen değerlerden çok farklı değildir. Oysa Prostaglandin F_{2α} ve vitamin-E katılan sperma bölümlerinde motilite oranı El-Gaffary et al.⁹ ile Gökçen ve arkadaşlarının¹⁰ da bildirdikleri gibi kontrol gruplarına kıyasla daha yüksektir. Nitekim El-Gaffary et al.⁹ 300 µg/ml. düzeyinde PGF_{2α} katılan koç spermasının sulandırdıktan sonra % 88, +5°C de 24 saat bekletildikten sonrada % 73 oranında canlılık gösterdiğini bildirmektedir. Gökçen ve arkadaşları¹⁰ da PGF_{2α} ve vitamin-E kattıkları koç spermalarında motilite oranının % 86 ve 89 olduğunu tespit etmişlerdir. Srivastava et al.¹¹ ise bizim elde ettiğimiz sonuçların aksine olarak kontrol ve alfatokoferol katılan sperma bölümlerinde motilite oranlarının sırasıyla % 66 ve % 83 olduğunu bildirmektedir. Ölü ve anormal spermatozoon oranları ise kontrol grubu ile paralellik göstermekle beraber zaman zaman daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun frotinin hazırlanması sırasındaki işlemler ile preparatın muayenesinde ortaya çıkan tesadüflere bağlı olabileceği düşünülebilir. Bu nedenle karşılaşılan bu dalgalanma gösteren değerler fazla önem taşımamaktadır.

Spermanın saklama süresi uzadıkça hem katkı maddelerini içeren sperma bölümlerinde, hemde kontrol gruplarında motilitenin gittikçe azaldığı, ölü ve anormal spermatozoon oranlarının ise arttığı görülmektedir. Kumar et al.⁷ ve Joshi et al.¹² nin elde ettiği sonuçlar, bizim bulgularımızı doğrular niteliktedir. Kumar et al.⁷ spermanın alındığı gün motilite ve canlı spermatozoon oranlarının % 87.0 ve 79.0 olduğunu 6 gün sonra ise aynı özelliklerin % 32.5 ve % 31.5 e kadar düştüğünü, bildirmektedirler. Joshi et al.¹² da yumurta sarısı-sodyum sitrat ile sulandırılıp 48 saat saklanan spermanın % 38.98 oranında motiliteye sahip olduğunu ileri sürmektedir.

Ancak saklama süresi boyunca belirli saatlerde saptanan değerler bazı araştırmacıların bildirdiği sonuçlarla benzer olmasına karşın, bazılarının elde ettiği sonuçlardan daha yüksek yada daha düşük olarak bulunmuştur. Nitekim Nikolov et al.¹³ nın 24 saat saklanan spermada bildirdiği % 60 oranındaki motilite değeri bizim bulgularımızdan daha düşük olmasına rağmen Petruzzi et al.⁸ süttozu, sodyum sitrat ve tris sulandırıcıları ile sulandırılmış spermalarda 120. saatte sırasıyla % 23.33; 26.00 ve 45.00 motilite oranı saptadıklarını bildirmektedirler. Oysa bizim araştırmamızda süttozu ve sodyum sitrat ile sulandırdığımız spermalarda 90. saatten sonra motil spermatozoon gözlenememiştir. Spermatozoonların son derece duyarlı hücreler olup, yapılan müdahalelerden büyük ölçüde etkilenmeleri yanında, gerek bizim gerekse anılan yazarların izlediği yöntemler arasında kimi farklılıkların bulunmasında göz önünde tutulursa araştırma sonuçlarının çok az derecede farklılık göstermesi bir çelişki olmayıp değişik uygulamaların doğal sonucudur.

Spermatozoonların toplam yaşama süresi 4 ayrı sulandırıcı ile sulandırılan sperma bölümlerinde farklı bulunmuştur. Glukoz fosfat ile sulandırılmış sperma örneklerinde, ısısı + 5°C ye düşürüldükten 90 saat sonra hiç motil spermatozoon bulunmamasına karşın, katkı maddeleri içeren sulandırıcı ile sulandırılmış olan spermalar, aynı sulandırıcıların katkı maddesi içermeyen bölümleri ile sulandırılmış spermalara kıyasla daha uzun süre canlılık göstermiştir. Tris ile sulandırılan spermalarda ise spermatozoonların canlı kalma süresi diğer gruplardan çok daha uzun olmuştur. Petruzzi et al.⁸ da benzer sonuçlar elde ettiklerini bildirmektedirler.

Tablodan da izlenebileceği gibi tris ile sulandırılmış spermada spermatozoonların daha uzun süre canlı kalması yanında, PGF_{2α} katılan sperma bölümünün saklama süresi içerisinde anılan spermatolojik özellikler yönünden daha iyi bir durumda bulunması araştırmanın memnuniyet verici yönüdür. BSA, PGF_{2α} ve vitamin-E içeren anılan sulandırıcılar ile sulandırılıp + 5°C de 30 saat süreyle saklanan spermaların istenilen spermatolojik özelliklere sahip olduklarını ve 1 gün süreyle + 5°C de saklayarak kullanıldığında yeterli dölvürimi sağlayabileceklerini ancak daha fazla bekletildiklerinde bu özelliklerinin büyük ölçüde kayba uğradığı düşünülebilir. Daader et al.¹⁴ da PGF_{2α} katılan spermada 24. saatte % 71 oranında motilite saptadığını bildirmektedir.

Sunulan bu çalışmanın bu konuda yapılmış olan sadece birkaç araştırmadan biri olması nedeniyle daha çok sayıda materyal üzerinde tekrarlanması gerektiğini de vurgulayarak, sulandırılmış spermaya dayalı olarak alanda kullanılmak üzere geliştirilmesi olası sun'i tohumlama model ve programlarının hazırlanmasında yardımcı olacağı söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. GÖKÇEN, H., ÇEKĞÜL, E., ŞENER, E., SOYLU, K.: Sulandırılmış koç spermasında bir tohumlama dozundaki aktif spermatozoon sayısı ile dölverimi arasındaki ilişkiler üzerinde araştırmalar. U.Ü. Vet. Fak. Derg., Sayı: 1-2-3, Cilt: 4, Yıl: 5, Sf. 83-87 (1985).
2. ÖZKOCA, A.: Koç spermasının sulandırılması ve saklanması konusunda araştırmalar. L.Z.A.E. Dergisi, 2(3-4), 84:92 (1962).
3. SAXENA, V.B., TRIPATHI, S.S.: Preservation of ram semen at 3-5°C. Indian Journal of Animal Sciences. 54, (8), 813-815 (1984).
4. ZLATAREV, S.T.: Studies on the artificial insemination of sheep with semen stored for 24 and 48 hours at 0-3° C. Anim. Breed. Abstr., 45:5415 (1977).
5. PAUFLER, S.K.: Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch. Verlag M.H. Schaper, Hannover, 1974.
6. ÖZKOCA, A.: Sulandırılarak saklanan koç spermasının sağladığı fertilité konusunda araştırmalar. L.Z.A.E. Dergisi, 4(1):55-62 (1964).
7. KUMAR, P., PRASAD, J.: A study on ram semen preservation at refrigeration temperature. Livestock Adviser, 12(11), 23-26 (1987).
8. PETRUZZI, V., TARANTINI, S., ROYCHOUDHURY, P.N.: Effect of different semen diluents on survival of ram spermatozoa at 5°C. Zbi. Vet. Med. A, 23, 556-561 (1976).
9. EL-GAAFARY, M.N.S.A., CHAMBERLAIN, A.G., AXFORD, R.F.E.: Survival rate and fertility of chilled ram semen supplemented with prostaglandin F_{2α}. In agricultural research and development in Wales, Third Conference, Aberystmyth, March (1986).
10. GÖKÇEN, H., AŞTI, R., ÇEKĞÜL, E., ŞENER, E.: Prostaglandin F_{2α} ve Vitamin-E katılarak dondurulan Koç Spermalarında Akrozom Morfolojisi ve Dölverimi Üzerinde Araştırmalar. U.Ü. Vet. Fak. Derg., Sayı: 1-2-3, Cilt: 4, Sf. 77-82 (1985).
11. SRIVASTAVA, R.S., MATHUR, A.K., KARLA, D.B.: Effect of alphatocopherol on preservability of ram semen. Indian Journal of Animal Sciences, 57(6), 553-554 (1987).
12. JOSHI, J.D., SINGH, G.: Studies on ram semen diluents. Indian J. Vet. Sci., 38: 574-582.
13. NIKOLOV, I., RADEV, G., MANOLOV, I.: A comparison of the effects of some semen diluents on the quality and fertilizing ability of fresh and stored ram semen. Zhivotnov'dni Nauki, 20 (16), 113-118 (1983).
14. DAADER, A.H., TAHA, A.: Survival rate of ram spermatozoa supplemented with PGF_{2α}. Anim. Breed. Abstr., 53:687 (1985).