



Damascus Irkı Tekelerde Farklı Sulandırıcıların Kısa Süreli Saklama ve Fertiliteye Etkisi

Mustafa ŞAHİN¹, *İlker YAVAŞ¹, Nurdan COŞKUN ÇETİN¹, Oğuz Kaan YALÇIN¹, Haydar DEMİREZER¹

¹Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, 31000, Hatay, Turkey

Received: 01.11.2021

Accepted: 14.02.2022

ÖZ

Bu çalışma, Damascus tekesi spermasının Tris sulandırıcısına ilave edilen farklı oranlarda şeker ve yumurta sarısının (YS) 4 °C'de bazı spermatolojik özellikler ve fertiliteye etkilerinin saptanması amacıyla yapıldı. Her grupta 8 dişi olacak şekilde biri kontrol (doğal aşım) olmak üzere toplamda 4 grup oluşturuldu. Fertilité parametreleri bakımından progesteron ölçümleri (21. gün) ve doğum oranları kaydedildi. Üreme sezonunda 4 adet tekeden haftada 2 defa sperma alındı. Spermalar birleştirildikten sonra 3 ayrı sulandırıcıyla (Grup 1: 1.3 g fruktoz, 0,2 g glikoz, %20 YS; Grup 2: 0.9 g fruktoz, 0.1 g glikoz, 3% YS; Grup 3: 0.2 g fruktoz, 0.1 g glikoz, %0 YS) sulandırıldı ve 96 saat süreyle 4 °C'de saklandı. 12-24. ve 36-60. saatlerde en düşük motilite grup 1'de saptanırken, en yüksek motilite ise grup 2'de kaydedildi ($p<0.05$). Anormal spermatozoon oranları bakımından gruplar arasında fark gözlenmedi ($p>0.05$). Ölü-canlı spermatozoon oranı bakımından 72. saate kadar en yüksek değer grup 1'de saptandı ($p<0.05$). Spermatolojik değerlendirmeler sonucunda %20 YS katılan grupta sperma kalitesinin saklama süresince belirgin oranda düşük olduğu, az oranda YS eklenen (%3) grupta ise yüksek motilite ve longevite saptandı. Gruplar ve doğal aşım arasında 21. gün gebelik ve doğum oranları bakımından fark görülmedi ($p>0.05$). Sonuç olarak Damascus teke spermasının kısa süreli saklanmasında Tris sulandırıcısına düşük miktarlarda yumurta sarısı ve şeker ilavesinin spermatolojik değerlere önemli derecede fayda sağladığı fertilité bakımından doğal aşım grubu ile benzer olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Doğum oranı, Fertilité, Keçi, Spermatozoon, Yumurta sarısı.

ABSTRACT

The Effect of Different Diluents on Short-Term Storage and Fertility in Damascus Goats

This study was carried out to determine effects of different proportions of sugar and egg yolk (EY) added to Tris in Damascus bucks on some spermatological properties and fertility at 4°C. Goats to be inseminated in a total of 4 groups with 8 females in each group, one of which was the control (natural breeding). Progesterone measurements and birth rates were recorded. During the breeding season semen was collected from 4 bucks twice a week. After pooling, semen diluted with 3 different diluents (Group 1: 1.3 g fructose, 0.2 g glucose, %20 EY; Group 2: 0.9 g fructose, 0.1 g glucose, 3% EY; Group 3: 0.2 g fructose, 0.1 g glucose, 0% EY) and stored for 96 hours. At 12-24, 36-60 hours, lowest motility was detected in group1 and highest motility in group2 ($p<0.05$). There was no difference between groups in abnormal spermatozoa rates ($p>0.05$). Highest value of dead-live spermatozoa ratio was determined in group1 until 72nd hour ($p<0.05$). Consequently, semen quality was found to be significantly lower in the group with of 20% EY, and highest motility and longevity were found in the group with a small amount of (3%) added EY. There was no difference in 21st-day pregnancy and birth rates between groups and natural breeding. Consequently, it was determined that addition of EY and sugar in low amounts to Tris diluent in short-term storage of Damascus buck semen provided significant benefits on spermatological values, was found to be similar to natural breeding group in terms of fertility.

Keywords: Birth rate, Egg yolk, Fertility, Goat, Spermatozoon.



GİRİŞ

Ülkemiz hayvancılığı için keçi yetiştiriciliği özellikle kırsal kesimlerdeki nüfusun başlıca geçim kaynaklarından (Kulaksız ve Daşkın 2007). Keçilerde üreme ve birim başına alınan verim özelliklerinin artırılması oldukça önemlidir. Suni tohumlama yöntemi ile üstün damızlık tekelerin spermalarının yaygın kullanımı önemli bir genetik ilerleme elde edilmesini sağlamaktadır (Üstüner ve Günay 2009). Damascus ırkı Suriye'den köken alan ve Filistin, Irak ve Türkiye gibi ülkeleri de kapsayan coğrafyada bulunan bir keçi ırkıdır (Al-Ghalban ve ark. 2004).

Suni tohumlama uygulamalarında kullanılmak üzere teke spermasının işlenmesi ve saklanması oldukça önemli bir adımdır. Tekelerde spermanın saklanması esnasında canlılık üzerine seminal plazmanın olumsuz etkileri bulunmaktadır (Purdy 2006). Tekelerde seminal plazmada var olan yumurta sarısı koagüle edici enzimin (EYCE), yumurta sarısındaki lisoletini hidrolize ederek toksik etkiye sebep olmaktadır. Bu olumsuzluklara spermanın santrifüjü yapılabile de işlem esnasında spermatozoonların zarar görebileceği unutulmamalıdır. Yapılan bazı çalışmalarda fertilitte artışına neden olmadığı da bildirilmiştir (Leboeuf ve ark. 2000). Sperma dondurularak ya da kısa süreli (+4-5°C) saklanabilmektedir. Dondurularak saklama kristalleşme sonucu ozmotik ve mekanik stres oluşturmakta ve serbest radikallerin oluşumunu artırmaktadır. Bu sebeple kısa süreli saklama sperma kalitesi ve fertilitte sonuçları bakımından tercih edilmektedir (Bucak ve Tekin 2007). Spermanın kısa süreli saklanmasında in vitro canlılığını ve dölleme potansiyelini uzatmak için pek çok araştırma yapılmış olmasına rağmen, sınırlı olumlu etkiler elde edilmiştir ve halen sulandırıcıların modifikasyonları denemektedir (Liu ve ark. 2016; Alçay ve ark. 2017).

Sperma sulandırıcıları tamponlayıcı maddeler, kriyoprotektanlar, lipoproteinler, şekerler, yağlar, proteinler, antibiyotikler ve enzimler ile antioksidan maddeler gibi diğer katkı maddelerini içermektedir (Gororo ve ark. 2019). Yumurta sarısı lipoproteinler sayesinde spermatozoonların membran bütünlüğünü artırmaktadır. Sulandırıcıya katılan şekerler hücre dehidrasyonunu ve membran stabilizasyonu sağlarlar ayrıca ozmotik basınç değişimlerine karşı spermatozoayı korurlar (Purdy 2006; Naing ve ark. 2010). Spermanın dondurulması için kullanılan kriyoprotektanlar soğuk şokuna karşı koruma sağlamaktadır. Optimum kriyoprotektanlar ve oranları türe özgü olup hücre zarının bazı özelliklerine göre belirlenmelidir. Gliserol, yaygın olarak kullanılan ve tekelerde koruyuculuğu fazla olan bir kriyoprotektandır. (Purdy 2006; Bezerra ve ark. 2011).

Keçilerde soğutulmuş sperma tohumlama sonrasında %54-65, dondurulmuş spermada ise %35-38 oranında fertilitte bildirilmiştir. Östrusların senkronize edilmesi durumunda soğutulmuş sperma ile doğal aşımındaki fertilitte oranına (%74) yakın fertilitte saptanmıştır (Mocé ve ark. 2020). Soğutulmuş spermanın kullanılması, tohumlamanın kısa bir zaman aralığında gerçekleştirilmesi durumunda, dondurulmuş sperma ile suni tohumlamaya önemli bir alternatiftir (Leboeuf ve ark. 2000; Çetin ve ark. 2020). Soğutulmuş sperma kolay nakliye, artan suni tohumlama dozu kullanımı gibi avantajlara sahiptir (Kharche ve ark. 2013).

Yapılan çalışmada Damascus spermasının Tris temelli sulandırıcıya ilave edilen farklı oranlarda şeker ve yumurta sarısının kısa süreli saklanmada spermatolojik özellikler (motilite, ölü-canlı ve anormal spermatozoon

oranları) ve suni tohumlama sonrasında fertilitte üzerine etkilerinin saptanması ve optimal sperma sulandırıcısının belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulunun 24.06.2020 tarih ve 2020/04-38 numaralı kararı ile izin alınmıştır. Çalışmada 4 adet 3-5 yaşlı Damascus ırkı teke, 32 adet dişi keçi kullanılmıştır. Biri kontrol (doğal aşım) olmak üzere 4 grup, her grup 8 dişiden oluşturulmuştur. Araştırmada kullanılan aile işletmesi 37.21441 enlem ve 36.97827 boylamda Gaziantep/Türkiye'de bulunmaktadır. Sağlık kontrolünden geçirilmiş sürüde 2 yaşından büyük tekeler rasgele seçilmiştir. Hayvanların beslenmesi yarı entansif şekilde yapılmıştır. Çalışmada kullanılan deneme grupları ve sulandırıcılar Tablo 1'deki gibi oluşturulmuştur.

Tablo 1. Sulandırıcı grupları ve içerikleri.

Table 1. Extender groups and their contents.

Bileşenler	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Fruktoz (g)	1.3	0.9	0.2
Glukoz (g)	0.2	0.1	0.1
Tris (g)	3.634	3.334	3.534
Sodyum sitrat (g)	1.99	1.99	1.99
Gliserol (%)	0	0	1.5
Yumurta Sarısı (%)	20	3	0
Distile Su (ml)	100 ml ye tamamlandı	100 ml ye tamamlandı	100 ml ye tamamlandı

Spermanın Alınması

Sperma tekelerden üreme mevsimi içerisinde elektro-ejakülatör (Ruakura Ram Probe, Manufactured for Shoof International Ltd, New Zealand) yardımı ile haftada 2 defa sabah 08:00 - 10:00 saatleri arasında Demirci (2002)'ye göre toplandı. Steril ve kayganlaştırılmış elektro-ejakülatörün probu rektuma yerleştirilerek 4-6 saniye aralıklarla elektrik uygulandı ve ejakülasyon şekilleninceye kadar tekrarlandı. Sperma alındıktan hemen sonra 37°C'lik su banyosu içerisine alındı ve hacim, mass aktivite ve motilite bakımından değerlendirildi. Hacim olarak >0.5 ml, sperma yoğunluğu >3x10⁹, mass aktivite >3, ve motilite >70% olan ejakülatlar kullanıldı. Toplamda 7 tekrar şeklinde sperma alınmıştır. Her hafta alınan spermalar bireysel farklılıkların olmaması açısından pooling işlemi yapılarak birleştirildi. Spermalar birleştirildikten sonra 3 ayrı sulandırıcıyla: Grup 1: 1.3 g fruktoz, 0.2 g glikoz, 1.99 g Sodyum sitrat, %0 Gliserol, %20 YS; Grup 2: 0.9 g fruktoz, 0.1 g glikoz, 1.99 g Sodyum sitrat, %0 Gliserol, %3 YS; Grup 3: 0.2 g fruktoz, 0.1 g glikoz, 1.99 gSodyum sitrat, %1.5 Gliserol, %0 YS sulandırılarak 100 ml'e tamamlandı. Spermalar 3 ayrı sulandırıcı ile (1:1 v/v) sulandırılarak +4 °C'ye soğutuldu. Sulandırılmış gruplar 96 saat süreyle +4 °C'de spermatolojik muayenesi için soğutmalı inkübatörde

saklandı. Sulandırılmış spermalar 0.25 ml'lik payetlere 200x106 dozunda (IMV Technologies, Normandiya) çekildikten sonra tohumlama anına kadar bu sıcaklıkta muhafaza edildi. Sulandırmada kullanılan Tris, Fruktoz, Glikoz, Sodrum sitrat, Gliserol, yumurta sarısından oluşan kimyasallar, Sigma (St. Louis, MO, USA) ve Merck (Darmstadt, Germany) şirketinden temin edildi.

Spermanın Muayenesi

Nativ spermada sperma hacmi derecelendirilmiş sperma toplama tüpleri kullanılarak belirlendi. Mass aktivitenin belirlenmesinde taze ejakulattan alınan bir damla sperma lamel kapatılmaksızın 10'luk büyütme altında mikroskopta 0-5 arasında skorlandı. Spermada pH metre kullanılarak değerler kaydedildi. Yoğunluk Makler sayım kamarası kullanılarak 10 karede sayılan spermatozoon sayısı ml'deki konsantrasyonu milyon olarak kaydedildi. Motilite muayenesinde taze sperma %2.9 sodyum sitrat ile sulandırılarak ve sulandırılmış spermada motilite 37 °C'ye ısıtılmış lam üzerine 20 µl sperma bırakıldı ve lamel kapatılarak değerlendirildi. Sulandırılmış sperma örnekleri motilite, canlılık, morfoloji yönünden incelendi. Eosin-nigrosin (1.67 g Eosin-Y, 10 g Nigrosin ve 2.9 g Sodyum Sitrat 100 ml Distile su) 1:1 oranında karıştırıldı ve ardından 37 °C'de ısıtma tablası üzerindeki lamalara frotiller çekildi ve 60 °C'de ayarlanmış inkübatör içerisinde kurutuldu. Işık mikroskobu (Olympus CX-41, Japonya) altında 400x büyütme altında 200 adet spermatozoon sayıldı ve ölü-canlı spermatozoonlar % olarak hesaplandı. Morfoloji değerlendirilmesinde, ışık mikroskobunda 1000x büyütme altında immersiyon yağı ile eosin-nigrosin boya ile boyanmış numuneler incelendi ve toplamda 200 spermatozoon sayılarak anormal spermatozoon oranı belirlendi.

Suni Tohumlama Uygulaması

Östrus tespitinde günde iki kez arayıcı tekeler kullanılarak yaklaşık 12 saatlik bir zaman aralığı ile kontrol edildi. Östrusta olan dişiler östrus tespitinden sonraki 12-24 saat arasında olacak şekilde 200x106 spermatozoon konsantrasyonu ile bir kez servikal yöntem kullanılarak tohumlandı. Tohumlanacak keçinin arka ayakları yukarıda kalacak şekilde yardımcı personel tarafından tutuldu. Vulva dudaklarının kuru temizliği yapıldıktan sonra spekulum vaginaya yerleştirilerek baş lambası yardımıyla serviks tespit edildi. Suni tohumlama kateteri spekulum içerisinden geçirilerek orifisyum uteri eksternaya yönlendirildi. Kateter serviks kanalından ilerletilip, kanal geçildikten sonra sperma verildi.

Gebelik Muayeneleri ve Fertilite Değerlendirmeleri

Tohumlama gruplarındaki tüm keçilerden suni tohumlama uygulamalarından 21 gün sonra kan örnekleri alındı. Kan örnekleri v. jugularisten mor kapaklı, vakumlu kan tüplerine alındı. Kan tüpleri 2000 devirde 10 dk santrifüj edildi ve plazma kısımları gruplara göre tasnif edilmiş ependorf tüplerine alındı. Plazma örnekleri progesteron analizi yapıncaya kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edildi. Alınan kan örneklerinden plazma progesteron ölçümleri Direct Chemiluminescence yöntemi (ADVIA Centaur® ReadyPack™, Siemens, USA) ile yapıldı ve 21. günde progesteron değeri $\geq 3-3,5$ ng/ml olanlar gebe olarak değerlendirildi. Doğum zamanında takipler yapılarak doğum oranları ve fertilite oranları gruplara göre sonuçlar kaydedildi. Araştırmada belirtilen fertilite parametreleri aşağıdaki formüllere göre değerlendirilmiştir (Karaca ve ark. 2021).

Gebelik oranı: Gebe keçi sayısı/Tohumlanan keçi sayısı x 100

Doğum oranı: Doğum yapan keçi sayısı / Gebe keçi sayısı x 100

İstatistiksel Analiz

Araştırmada elde edilen sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama ve standart sapma hesaplandı. İstatistiksel analizler SPSS 23.0 paket program (Version 23.0 Armonk, NY: IBM Corp.) ile yapıldı. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde spermatolojik değerlendirmelerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Analiz sonucunda gruplar arası farkın önemini belirtmek için Duncan testi kullanıldı. Progesteron seviyelerine göre 21. gün gebelik oranları ve doğum oranlarının değerlendirmesinde Chi-Square (X^2) testi uygulandı, istatistiki değerlendirmelerde önem durumları Pearson-Ki kare değerleri ve önem sonuçlarına göre yapıldı.

BULGULAR

Sperma 7 tekrar şeklinde alındı. Birleştirilmiş nativ spermada ortalama değerler ve standart hatalar sırasıyla miktar (ml) 3.92 ± 0.15 (bireysel 0.98 ± 0.04 ml), motilite (%) 85.00 ± 1.54 , yoğunluk (109/ml) 3.40 ± 0.15 , anormal spermatozoon oranı (%) 5.53 ± 0.70 , ölü spermatozoon oranı (%) 10.73 ± 0.84 ve pH 6.61 ± 0.05 olarak saptandı.

Sulandırma sonrasında motilite değerlendirmesi Tablo 2'de sunulmuştur. 0. saatte deneme grupları arasında fark gözlenmedi ($p > 0.05$). Grup 2 ve grup 3 12. ve 24. saatlerde grup 1'e kıyasla önemli derece daha yüksek motiliteye sahipti ($p < 0.05$), 36, 48 ve 60. saatlerde sırasıyla en yüksek motilite grup 2'de saptanırken en düşük motilite grup 1'de saptandı ($p < 0.05$). 72. saatte grup 1'de motilite sonlandı, grup 2 ve grup 3, grup 1'e kıyasla istatistiki olarak yüksek motiliteye sahip ve grup 2'de en yüksek motilite değeri kaydedildi ($p < 0.05$). Grup 2'de 96 saat süreyle motilite devam etti.

Sulandırılmış spermada deneme grupları arasında anormal spermatozoon oranı Tablo 3'te görüldüğü gibi, 12 saatte bir yapılan değerlendirmelerde gruplar arası istatistiki fark belirlenmedi ($p > 0.05$). Ölü spermatozoon oranı bakımından yapılan değerlendirme Tablo 4' de verilmiştir. Buna göre, ilk 24 saatte sulandırıcı grupları arasında fark gözlenmedi ($p > 0.05$). 36-72. saatler arasında grup 1'de, grup 2 ve grup 3 gruplarına kıyasla daha yüksek oranda ölü spermatozoon saptandı ($p < 0.05$). Grup 1 48. saatte diğer gruplardan belirgin derecede yüksek iken grup 2 en düşük ölü spermatozoon oranına sahip bulundu ($p < 0.05$). 60. saatte grup 1, grup 2'ye kıyasla belirgin olarak yüksek derecede ölü spermatozoon oranına sahip iken ($p < 0.05$), grup 2 ve grup 3 ise benzer saptandı. Bu saatten itibaren 96 saatlik saklama süresince gruplar arası fark önemsizdi ($p > 0.05$).

Fertilite değerleri bakımından istatistiki fark (Tablo 5.) suni tohumlama ve doğal aşım yapılan gruplar arasında istatistiki açıdan önemsiz bulundu ($p > 0.05$). 21. gün gebelik oranları bakımından ortalama değer %75 ($27/36 \times 100$) olarak belirlendi.

Doğum oranları ortalaması ise %100 ($27/27 \times 100$) olarak saptandı.

Tablo 2. Deneme grubu sulandırılmış sperma örneklerinin +4 °C’de zamana bağlı motilite değerleri.**Table 2.** Time dependent motility values of the diluted semen samples of the experimental group at +4 °C.

Gruplar	0. saat	12. saat	24. saat	36. saat	48. saat	60. saat	72. saat	84. saat	96. saat
Grup 1	85.5±1.8	63.3±2.1 ^b	35.0±2.5 ^b	24.6±2.9 ^c	14.4±2.8 ^c	9.4±2.3 ^c	0	0	0
Grup 2	87.6±2.4	75.5±2.6 ^a	59.5±3.7 ^a	46.5±2.6 ^a	41.6±1.9 ^a	22.8±1.3 ^a	9.0±0.6 ^a	4.1±0.3	3.0±0.3
Grup 3	89.1±2.6	76.6±3.2 ^a	54.5±5.2 ^a	34.5±5.2 ^b	29.2±3.9 ^b	15.0±2.6 ^b	6.1±2.4 ^b	0	0
P	0.091	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.007	0.658	0.203

a-c: Her bir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan önemlidir (p<0.05).

Tablo 3. Deneme grubu sulandırılmış sperma örneklerinin +4 °C’de zamana bağlı anormal spermatozoon oranları.**Table 3.** Time-dependent abnormal spermatozoa rates of the diluted semen samples of the experimental group at +4 °C.

Gruplar	0. saat	12. saat	24. saat	36. saat	48. saat	60. saat	72. saat	84. saat	96. saat
Grup 1	17.1±1.9	18.4±1.9	20.1±1.9	21.4±1.9	22.6±2.0	22.7±1.9	27.3±1.8	29.2±1.6	29.2±1.6
Grup 2	16.3±2.8	19.0±2.4	20.3±2.3	22.3±2.4	21.6±2.7	26.6±2.5	31.5±1.5	36.5±1.5	36.5±1.5
Grup 3	18.9±1.8	20.8±1.9	21.6±1.9	23.8±1.8	26.4±1.9	27.3±1.5	28.8±1.4	33.6±0.7	33.6±0.7
P	0.921	0.897	0.910	0.814	0.816	0.918	0.655	0.159	0.159

İstatistiki açıdan önem bulunmamaktadır (p>0.05).

Tablo 4. Deneme grubu sulandırılmış sperma örneklerinin +4 °C’de zamana bağlı ölü spermatozoon oranları.**Table 4.** Time-dependent dead spermatozoa rates of the diluted semen samples of the experimental group at +4 °C.

Gruplar	0. saat	12. saat	24. saat	36. saat	48. saat	60. saat	72. saat	84. saat	96. saat
Grup 1	11.5±2.9	22.3±3.1	48.8±3.6	57.6±3.0 ^a	76.7±4.9 ^a	80.2±3.3 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0	100.0±0.0
Grup 2	10.5±2.7	18.8±3.2	39.5±2.1	47.0±4.3 ^b	48.0±2.8 ^c	67.5±3.2 ^{bc}	90.6±1.6 ^b	97.7±0.1	98.9±0.1
Grup 3	10.0±1.8	20.0±2.6	39.0±1.9	44.0±4.7 ^b	61.4±2.6 ^b	72.8±3.9 ^b	93.1±2.5 ^b	93.5±2.1	100.0±0.0
P	0.915	0.763	0.058	0.046	0.023	0.037	0.049	0.061	0.951

a-c: Her bir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan önemlidir (p<0.05).

Tablo 5. Fertilite Parametreleri.**Table 5.** Fertility Parameters.

Parametreler	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Kontrol (Doğal Aşım)	P
21. gün Gebelik Oranları	8/8 (%100)	8/7 (%87.5)	8/6 (%75)	8/6 (%75)	0.456
Doğum Oranları	8/8 (%100)	8/7 (%87.5)	8/6 (%75)	8/6 (%75)	0.456

İstatistiki açıdan önemi bulunmamaktadır (p>0.05). Fertilite parametrelerinin değerlendirilmesinde Pearson Chi-Square testi kullanıldı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaptığımız çalışmada elde edilen taze sperma değerlerinden sperma hacmi, yoğunluk, ölü ve anormal spermatozoon oranları, daha önceki yapılan çalışmalar (Kharche ve ark. 2013; Anand ve ark. 2017; Gororo ve ark. 2019) ile uyumlu olduğu saptandı.

Sulandırıcılara yumurta sarısı ilaveleri farklı oranlarda yapılmaktadır. YS, lesitin ve lipoprotein içeriği sayesinde soğuk şokuna bağlı hasarları önlemektedir. Ancak teke seminal plazmada bulunan bulboüretal bez kaynaklı EYCE enziminden dolayı yumurta sarısı lesitini yağ asitleri ve lisolesitine çevrilerek sulandırıcıda koagülasyona yol açabilmektedir (Ngoma ve ark. 2016).

Araştırmacılar %12-20 yumurta sarısı oranlarında yüksek motilite, düşük anormal ve ölü-canlı spermatozoon oranı bildirmektedir (Çetin ve ark. 2020; Sun ve ark. 2020). Debbarma ve ark. (2019) yumurta sarısı temelli sulandırıcılarda daha yüksek motilite ve canlılık bildirmişlerdir. İrk farklılığı, sperma sulandırma teknikleri, yumurta sarısı oranı, seminal plazmanın ayrılıp ayrılmaması, sperma toplama metodu, saklama şekli, sulandırıcı kompozisyonu sonuçların farklı çıkmasında etkili olmaktadır. Yapılan çalışmada motilite, ölü-canlı spermatozoon oranı ve longevite bakımından az miktarda YS ve şeker ihtiva eden grup 2, diğer gruplara kıyasla belirgin olarak yüksek bulundu. Yüksek oranlarda yumurta sarısı ve şeker ilavesinin yapıldığı grup 1 ise en düşük sperma kalitesine sahip olduğu saptandı. Tris-yumurta sarısı sulandırıcısında yüksek YS oranının viskoziteyi artırarak motilite değerlerini düşürmüş olabileceği ve kaliteyi olumsuz etkilediği düşünülmektedir.

Mutlak (2019) Tris sulandırıcısında %10 veya daha az YS oranlarının teke spermasının saklanması motilite ve morfolojik açıdan yararlı olduğu sonucuna varmıştır. Santiago-Moreno ve ark. (2006) Tris sulandırıcısında yumurta sarısının %6 ve %20 oranlarını değerlendirmişler ve düşük doz YS konsantrasyonunda daha yüksek motilite bildirmişlerdir. Bu bulgular çalışmamız ile paralel yöndedir.

Ferreira ve ark. (2014) YS-sodyum sitrat sulandırıcısında %5 ve %10 yumurta sarısı değerlendirmişler ve en iyi sonuçlar %10 yumurta sarısında belirlenmiştir. Daşkın ve Tekin (1996) dondurulmuş çözündürülmüş teke spermasında %20 yumurta sarısı ilavesinin %0 yumurta sarısı ilavesine kıyasla daha yüksek motilite sağladığını bildirmişlerdir. Yüksek miktardaki YS'nin yapısındaki fosfolipidler ile hücre membran fosfolipidlerinin kaybını telafi ederek yüzeyde koruyucu tabaka sağladığı ve daha iyi koruma sağlayabileceği kaydedilmektedir (Ferreira ve ark. 2014). Yüksek YS oranında motilitenin ve kalitenin yüksek saptanması bulgularımızın aksi yönündedir. Farklılıklar farklı YS oranlarından, ırk, yaş, mevsim ve diğer faktörlere bağlı olarak değişebilir (Bispo ve ark. 2011).

Memon ve ark. (2013) Tris sulandırıcısında farklı doz YS ilavesinin dondurma öncesi ve çözdürme sonrasında motilite değerini sırasıyla en yüksek %18, %12 ve %6 oranlarında bildirmişlerdir. Tar ve ark. (2017) farklı oranlarda yumurta sarısının etkisini inceledikleri çalışmada (%15 ve %20) motilite ve morfoloji bakımından %20 YS oranını tavsiye etmişlerdir. Bildirilen sonuçlar, çalışmamızda yüksek seviyede yumurta sarısının düşük spermatozoolik kaliteye sahip olması yönü ile aksi yöndedir. Çalışmada yüksek yumurta sarısının spermatozoolik kaliteyi düşürmesi bazı araştırmacılar ile uyumlu (Medrano ve ark. 2010; Gororo ve ark. 2019) saptandı. Farklı sonuçlar, ırk farklılığından dolayı EYCE'ye hassasiyetin farklı olmasıyla ilişkili olabilir (Purdy 2006; Memon ve ark. 2013). Çalışmamızda YS oranının artması sperm solunumu engelleyebilmekte ve motilite ile canlılıkta düşmeye sebep olabilmektedir. Anand ve ark. (2017) kısa süreli saklanan teke spermasında Tris temelli sulandırıcıda (%6 gliserol) %2.5, 5, 10, 15 ve 20 oranlarında YS ilavesinin etkisini inceledikleri çalışmada %15 YS seviyesinin canlılık, motilite bakımından optimum olduğunu bildirmişlerdir. En düşük canlılık ise %2.5 ve 5 oranlarında ve en düşük motilite %2.5 YS oranında bildirilmiştir. Düşük seviyelerde YS ilavesinin sperm membranlarındaki oksidatif strese karşı koruma sağlayamadığı ve buna bağlı sperma kalitesini düşürebileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Anand ve ark. 2017). Bildirilen bulgular çalışmamız ile

çelişmektedir. Farklı araştırmacılar ırka bağlı olarak YS'nin farklı oranlarını tavsiye etmişlerdir (Gunjan ve ark. 2014; Ranjan ve ark. 2015) ve sulandırıcıya katılan YS oranının belli bir standardı bulunmamaktadır. YS'nin seminal plazma ile etkileşimleri sonucunda hareket özelliklerini değiştirerek negatif etkilerinin yanı sıra artan oranlarının soğuk şokuna karşı spermatozoonları koruduğu da bildirilmiştir (Anand ve ark. 2017).

Bispo ve ark. (2011) sodyum sitrat-glukoz-EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) sulandırıcısında farklı YS oranlarını (%20 ve %2.5) denemişler ve motilite bakımından gruplar arası farklılık olmamasına rağmen düşük YS oranının canlılık ve morfoloji yönünden daha iyi sonuçlar verdiğini göstermişlerdir. Cseh ve ark. (2012) düşük seviyede yumurta sarısının (%2.5), yüksek dozlarının sebep olduğu toksik etkilerinden kaçınılabileceğini göstermektedir. Düşük YS oranında yüksek spermatozoolik kalite çalışmamızla benzer özellik taşımaktadır.

Sulandırıcılara yapılan şeker ilavesi, canlılığa faydalı olabilmekte, spermatozoonun fiziksel ve kimyasal bileşimindeki farklılıklar nedeniyle türler arasında değişik sonuçlar vermektedir (Purdy 2006). Sulandırıcılarda farklı şeker ilavelerinin etkisini inceleyen araştırmacılar (Naing ve ark. 2010; Şen ve Kulaksız 2017) Tris bazlı sulandırıcıda glukoz ve fruktozda benzer motilite, canlılık ve anormalite bildirmişlerdir. Ponglowhapan ve ark. (2004) glukozun spermatozoonlar için esansiyel enerji kaynağı olduğunu ve motiliteyi desteklediğini kaydetmişlerdir. Glikozun keçi spermatozoa metabolizması için mükemmel bir şeker olduğu öne sürülmüştür (Purdy 2006). Fruktozun teke sperması için osmolarite değerinin oldukça uygun olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Qureshi ve ark. 2013). Yapılan çalışmada fazla oranda şeker ilavesinin yapıldığı grupta spermatozoolik kalite düşük saptandı. Sperma özelliklerinde gözlenen farklılıklar tür veya bireysel varyasyon, saklama sıcaklığı, tamponlayıcı tipi, sulandırıcı çeşidi gibi birçok faktöre bağlı olabilir (Naing ve ark. 2010).

Sulandırıcıya yapılan gliserol ilavesinin tekelerde sperma kalite parametrelerinde bir azalma gösterdiğini ve kriyoprotektan olarak gliserol kullanımının insan ve tekelede spermatozoonun zar bütünlüğü üzerinde zararlı bir etkisi olduğu kaydedilmiştir (Qureshi ve ark. 2013). Gliserolün yüksek seviyelerinin, akrozom hasarını artırdığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda gliserol ile birlikte yüksek oranda fruktoz kullanılmasının bu hasarı giderilebileceği kaydedilmiştir (Yıldız ve ark. 2000). Yapılan çalışmada gliserol içeren sulandırıcıda ortalama bir sperma kalitesinin görülmesi bu bulguları desteklememektedir. Qureshi ve ark. (2013) sulandırıcıda yumurta sarısı ve gliserol oranları belli değerleri aştığında motilitede düşüşe yol açtığını göstermiştir. Sonuçlarımız bu bulgular ile uyumludur. Kulaksız ve ark. (2013) farklı ırk tekelede yaptıkları çalışmada farklı gliserol konsantrasyonlarının uzun süreli saklamaya etkisini araştırmışlar ve keçi ırkları için uygun gliserol yüzdelerinin farklı etkilere sahip olabileceğine işaret etmişlerdir. Büyükleblebici ve ark. (2014) Ankara tekelelerinde Tris temelli sulandırıcıda farklı dozlarda gliserol, etilen glikol ve DMSO (Dimetil sülfoksit)'nin etkisini değerlendirdikleri çalışmada gliserol üstün saptanmıştır. Çalışmamızda %1.5 olarak kullanılan gliserol oranımız, diğer uygulama gruplarına göre ortalama sperma kalitesi sağlamıştır.

Servikal tohumlamada sulandırılmış veya taze sperma kullanılarak yapılan tohumlama sonrasında gebelik

oranlarının %16-80 aralığında oldukça değişken olduğu bildirilmiştir (Leethongdee ve ark. 2013; Yotov ve ark. 2016; Erarslan ve Karaca 2017). Yapılan çalışmada ortalama %75 olarak bildirilen gebelik oranı bazı araştırmacılar ile benzer (Leethongdee ve ark. 2013; Liu ve ark. 2016); bazılarında yüksek (Leboeuf ve ark. 2000; Kharche ve ark. 2013; Qureshi ve ark. 2013; Yotov ve ark. 2016; Karaca ve ark. 2021) bildirilmiştir. Bildirilen değişik oranlardaki gebelik oranları keçi ırkı, spermatozoon kalitesi, sezon, iklim, tohumlama tekniği, yönetim uygulamalarına bağlı olarak şekillenmiş olabilir.

Yaptığımız çalışmada, sulandırıcı grupları ile elde ettiğimiz doğum oranı, Karaca ve ark. (2021) benzer, Arrebola ve ark. (2013) ile Mocé ve ark. (2020)'dan yüksektir. Yapılan çalışmada doğum oranı sonuçlarının yüksek çıkması östrusun doğal olması veya hormonal yöntemlerle senkronizasyon yapılması arasında farkla ilişkili olabilmektedir. Çalışmada farklı yumurta sarısı ve şeker oranları denenmiş ve gruplar arası fertilitite oranları bakımından fark saptanmamıştır, bu sonuçlar düşük YS oranındaki sulandırıcılarda daha yüksek fertilitite sonuçları bildiren araştırmacıardan farklıdır (Barbas ve ark. 2006). Yapılan çalışmalardaki fertilitite farklılıkları; spermanın saklanması, ırk, yaş, vücut kondisyon skoru, östrüs senkronizasyon protokolü, suni tohumlama zamanı, sayısı ve tohumlama dozları ile ilişkilendirilebilir (Leboeuf ve ark. 2000; Arrebola ve ark. 2013; Moce ve ark. 2020; Karaca ve ark. 2021).

Sonuç olarak Damaskus teke spermasının 4 °C'de kısa süreli saklanması Tris sulandırıcısına düşük miktarlarda yumurta sarısı ve şeker ilavesinin spermatozoid kalite bakımından faydalı olduğu, fertilitite açısından bu sulandırıcı ile yapılan suni tohumlama uygulamasının doğal aşım kadar iyi sonuçlar verdiği kanaatine varılmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Prof. Dr. Fikret KARACA ve Prof. Dr. Cengiz YILDIZ'a çalışmaya yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederiz.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: İY, MŞ
Denetleme/Danışmanlık: İY
Veri Toplama ve/veya İşleme: MŞ, NCC, OKY, HD
Analiz ve/veya Yorum: İY, MŞ
Makalenin Yazımı: İY, MŞ, NCC
Eleştirel İnceleme: İY

KAYNAKLAR

- Al-Ghalban AM, Tabbaa MJ, Kridli RT (2004). Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. *Small Rumin Res*, 53 (1-2), 141-149.
- Alçay S, Tokar MB, Onder NT, Gokce E (2017). Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*, 74, 81-85.
- Anand M, Baghel G, Yadav S. (2017). Effect of egg yolk concentration and washing on sperm quality following cryopreservation in Barbari buck semen. *J Appl Anim Res*, 45 (1), 560-565.
- Arrebola F, González O, Torres R, Abecia JA (2013). Artificial insemination in Payoya goats: factors affecting fertility. *Anim Prod Sci*, 54 (3), 356-362.

- Barbas JP, Marques CC, Baptista MC et al. (2006). Reproduction in the goat Serrana breed: seasonal and individual factors affecting fresh and frozen semen performance, in vivo and in vitro fertility. In: International Symposium on Comparative Advantages for Typical Animal Products from the Mediterranean Areas, Vale de Santarém, Portugal.
- Bezerra FSB, Castelo TS, Alves HM et al. (2011) Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethyl formamide for freezing goat semen. *Cryobiology*, 63, 263-266.
- Bispo C, Pugliesi G, Galvão P et al. (2011). Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Rumin Res*, 100 (1), 54-58.
- Bucak MN, Tekin N (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rumin Res*, 73, 103-108.
- Büyükleblebici S, Tuncer PB, Taşdemir U ve ark. (2014). The comparison of three different cryoprotectants in cryopreservation of angora goat semen. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20 (4): 613-619.
- Çetin NC, Kaan OK, Ates, CT, Karaca F (2020). Effect of royal jelly on quality of chilled semen from Damascus buck. *J Vet Andr*, 5 (1), 7-17.
- Cseh S, Faigl V, Amiridis GS (2012). Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim Reprod Sci*, 130 (3-4), 187-192.
- Daşkın A, Tekin N (1996). The Effect of Egg-Yolk on The Quality of Frozen Angora Buck Semen. *Turk J Vet Anim Sci*, 20, 395-398.
- Debbarma V, Sinha S, Singh LK, Deka BC, Biswas RK et al. (2019). Effect of Extenders on Semen Quality of Beetal Bucks Preserved at 5 C. *J Entomol Zool Stud*, 7 (5), 278-282.
- Demirci E (2002). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon. Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Fırat Üniv Vet Fak Ders Teksiri No:53. Elazığ.
- Erarslan C, Karaca F (2017). Üreme mevsiminde vaginal sünger ve kulak implantı uygulamalarıyla senkronize edilen kıl keçilerinde farklı zamanlarda yapılan servikal tohumlamaların gebelik oranlarına etkisi. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 12 (1), 63-70.
- Ferreira VS, Mello MRB, Fonseca CEM et al. (2014). Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of goat semen. *Rev Bras de Zootec*, 43 (10), 513-518.
- Gororo E, ZuluPT, Chatiza FP, Mhuka C (2019). Effects of different extenders and storage temperatures on longevity of small East African goat (Capra hircus) semen. *Small Rumin Res*, 175, 83-89.
- Gunjan B, Anand M. and Yadav S (2014). Effect of different egg yolk conc. On sperm membrane integrity in Barbari buck subjected to cryopreservation. *Vet Pract*, 15, 264-266.
- Karaca F, Çetin NC, Yalçın OK, Ateş CT (2021). Üreme sezonunda senkronize edilen keçilerde dondurulmuş sperma ile farklı zamanlarda yapılan servikal tohumlamaların gebelik oranlarına etkisi. *Van Sağ Bil Derg*, 14 (1), 41-49.
- Kharche SD, Jindal SK, Priyadharsini R. et al. (2013). Fertility following frozen semen artificial insemination in Jamunapari goats. *Indian J Anim Sci*, 83 (10), 1071-1073.
- Kulaksız R, Daşkın A (2007). Teke Spermasının Kısa ve Uzun Süreli Saklanması. *Vet Hekim Der Derg*, 78 (4), 51-56.
- Kulaksız R, Ari UC, Daşkın A, Üner AG (2013). The effect of different glycerol concentrations on freezability of semen from Angora, Kilis and Saanen goats. *Slovak J anim sci*, 46 (2), 39-44.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, 62, 113-141.
- Leethongdee S, Lieangcharoen N, Thuangsantha A (2013). The fertility rate following the superficial cervical artificial Insemination with fixed time system after the induction of oestrus and ovulation in mixed bred goats. *Reprod Domest Anim*, 48, 112.
- Liu CH, Dong HB, Ma DL et al. (2016). Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. *Anim Reprod Sci*, 164, 47-56.
- Medrano A, Terrazas A, Soto R (2010). Principles and perspectives for the conservation of goat buck spermatozoa. *Small Rumin Res*, 89 (2-3), 140-143.
- Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M (2013). Effect of buffers and egg yolk concentrations on chilled and frozen-thawed Boer goat spermatozoa. *Res Opin Anim Vet Sci*, 3 (10), 374-379
- Mocé E, Lozano-Palazón SA, del Mar Martínez-Granell M, Mocé ML, Gómez EA (2020). Effect of the Refrigeration System on In Vitro Quality and In Vivo Fertility of Goat Buck Sperm. *Animals*, 10 (12), 2399.
- Mutlak NK (2019). The impact of adding different levels of egg yolk on the motility and morphology pre and post thaw cryopreservation of goat semen. *AJVS*, 12 (1).

- Naing SW, Wahid H, Azam KM et al. (2010).** Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, 122 (1-2), 23-28.
- Ngoma L, Kambulu L, Mwanza M (2016).** Factors influencing goat's semen fertility and storage: a literature review. *J Hum Ecol*, 56, 114-125.
- Ngoma S, Essén-Gustavsson B, Linde Forsberg C (2004).** Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62 (8), 1498-1517.
- Purdy PH (2006).** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum Res*, 63, 215-225.
- Qureshi MS, Khan D, Mushtaq A, Afridi SS (2013).** Effect of extenders, postdilution intervals, and seasons on semen quality in dairy goats. *Turk J Vet Anim Sci*, 37, 147-152.
- Ranjan R, Goel AK, Ramachandean N, Kharche SD, Jindal SK (2015).** Effect of egg yolk and equilibration period on freezability of jamunapari buck semen. *Ind J Small Rumin Res*, 21, 32-36.
- Santiago-Moreno J, Toledano-Díaz A, Pulido-Pastor A (2006).** Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 66 (5), 1219-26.
- Sun L, Fan W, Wu C et al. (2020).** Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*, 92, 146-150.
- Şen ÇÇ, Kulaksız R (2017).** Kısa süreli teke spermasının saklanması farklı şekerlerin sperma kalitesi üzerine etkisi. *BAUN Sağ Bil Derg*, 6 (3), 104-107.
- Tar M, Towhidi A, Zeinoaldini S, Zhandi M, Zadeh MHM (2017).** Determination of the egg yolk optimum level in the goat sperm freezing extender by In vitro evaluations. *Iran J Appl Anim Sci*, 49 (3), 361-370.
- Üstüner B, Günay Ü (2009).** Teke Spermasının Saklanması ve Suni Tohumlama. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 28 (1), 53-58.
- Yıldız C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T (2000).** Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54, 579-585.
- Yotov SA, Velislavova DV, Dimova LR (2016).** Pregnancy rate in Bulgarian White milk goats with natural and synchronized estrus after artificial insemination by frozen semen during breeding season. *Asian Pac J Reprod*, 5 (2), 144-147.