

Köpek Spermalarının Kısa Süreli Saklanabilirliği Üzerine Düşük Gliserol Oranlarının Etkileri

Cengiz YILDIZ¹ Mehmet ATAMAN² Abdullah KAYA² Necdet LEHİMCİOĞLU³ Fetih GÜLYÜZ¹

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'ı Tohumlama Anabilim Dalı -VAN

²Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'ı Tohumlama Anabilim Dalı- KONYA

³Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'ı Tohumlama Anabilim Dalı- KARS

ÖZET

Sunulan araştırmada, tris sulandırıcısına ilave edilen düşük gliserol oranlarının köpek spermalarının kısa süreli saklanabilirliği üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla 4 köpekten penis masajı yöntemiyle sperma örnekleri alındı. Elde edilen sperma dört eşit kısma bölündü ve kontrol (gliserolsüz), %1 - 2 ve 4 oranlarında gliserol içeren tris sulandırıcıları ile 32 °C 'de 1/5 oranında ayrı ayrı sulandırıldı. Sulandırılan sperma örnekleri 96 saat süreyle 5 °C 'de bekletildi ve günlük olarak spermatolojik muayeneleri yapıldı. Bu süre sonunda en yüksek motilite, en düşük ölü spermatozoon ve bozuk akrozomlara ait ortalamalar sırasıyla %20.6±9.03, %19.1±5.27 ve %34.5±2.20 'lik oranla gliserol içermeyen kontrol grubu sulandırıcıda bulundu. Spermatolojik özellikler yönünden yapılan istatistikî karşılaştırmalarda, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında önemli farklılıklar belirlendi (P<0.05-P<0.001). Sunulan çalışmada köpek spermalarının spermatolojik özellikleri üzerine sulandırıcıya ilave edilen tüm gliserol oranlarının 48. saatten başlayarak motiliteyi baskıladığı, %4 oranında ilave edilen gliserolün ise spermatozoon canlılığı üzerine toksik etkili olduğu ve akrozom hasarlarında artış meydana getirdiği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler : Sperma, Gliserol, Kısa Süreli Saklama

Studies on the Effect of Low Glycerol Rates on the Storage of Dog Semen for a Short Time

SUMMARY

In the present study , the effect of low glycerol rates in addition to tris extender on short time storage of dog semen was investigated. For this purpose, semen samples were collected by digital manipulation from a total of 4 dogs. The collected semen was divided into four equal portions. Glycerol was added to tris extender in 1, 2 and 4% in three different tubes, and fourth tube contained no glycerol as a control. Then, all four semen samples were diluted at 32 °C in a waterbath with tris extenders prepared above in respective order as one part semen and four part tris extender. The diluted semen samples were kept in 5 °C for 96 hours and spermatologic examination were made daily. After 96 hours storage, the highest progressive motility rate, lowest dead sperm rates and lowest damaged acrosoma were 20.6±9.03, 19.1±5.27 and 34.5±2.20 % respectively in control supplemented group. These results were significantly (P<0.05-P<0.001) different compared to the other supplement groups. As a result, all glycerol rations added to the tris extender were found to depress motility starting from 48^h hours. Furthermore, addition of 4% glycerole had a toxic effect on sperms and increased acrosomal damages.

Key Words : Semen, Glycerol, Short Time Storage

GİRİŞ

Köpeklerde dondurulmuş spermayla yapılan sun'ı tohumlama uygulamalarına ek olarak 5°C de saklanan sulandırılmış sperma ile de sun'ı tohumlama işlemi başarılı bir şekilde yapılabilmektedir. Alınan sperma çeşitli sulandırıcılar ile belirli oranlarda sulandırılarak, spermatozoonların yaşam sürelerinin uzatılması ve fertilité oranlarının artırılması sağlanabilmektedir.

Bu amaçla değişik araştırmacılar, sulandırıcı içerisinde çeşitli doğal, kimyasal ve kryoprezervatif maddeleri içeren farklı sulandırıcıları kullanarak köpek spermalarının 4-5 °C 'de saklanabilirliği üzerine etkilerini araştırmışlardır. Spermatozoonları soğuk olumsuz etkilerine karşı koruyabilmek için sperma sulandırıcılarına çeşitli kryoprotektif maddeler ilave edilmektedir.

Philips (16) ilk kez spermanın kısa süreli saklanması için gliserolün olumlu koruyucu etkilerini bildirmiştir. Gliserolün

hücrelerde membran bütünlüğünü koruyucu etkisine ek olarak (2,11,25), bir enerji kaynağı şeklinde de görev yaptığı belirtilmiştir (13,14). Çeşitli araştırmacılar, boğa spermalarının kısa süreli saklanması sulandırıcıya ilave edilen değişik oranlardaki gliserolün, spermanın saklanabilirliği üzerine önemli (1,9, 10), veya sınırlı (20) oranda olumlu etkilerini saptamışlardır.

Köpek spermalarının kısa süreli saklanmasında gliserolün etkilerini araştıran Foote (7) sitrat sulandırıcısında %8 gliserol oranının toksik olduğunu, Proviencie ve ark (17)'i ise tris sulandırıcısı içerisinde %3 'lük gliserol oranının herhangi bir etkisini gözleyemezken, %6 'lık oranın toksik etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, köpek spermalarının kısa süreli saklanabilirliği üzerine tris sulandırıcısı içerisinde ilave edilen %0 (kontrol) - 1-2 ve 4 oranlarındaki gliserolün etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Yapılan çalışmada 3-5 yaşlı, 17-30 kg arasında, çeşitli ırklardan dört adet melez erkek köpek kullanıldı. Çalışmada kullanılan köpeklerin herbirinden, Tekin ve ark (24)'nın bildirdiği penis masajı yöntemiyle sperma üç gün aralıklarla 3 kez alındı ve spermadan zengin orta sekretin spermatolojik muayeneleri yapıldı.

Araştırma esnasında motilite, yoğunluk, ölü ve anormal spermatozoon oranlarının tespiti Tekin (23) 'in bildirdiği yöntemlere göre değerlendirildi. Ölü spermatozoon oranı için eozin-nigrozin (5), anormal spermatozoon oranı için ise nigrozin-eozin (4) boyaları kullanılarak frotiler hazırlandı ve toplam 200 spermatozoon sayılarak yüzde oranları belirlendi.

Araştırmada kullanılan tris sulandırıcısı Rota ve ark (18)'na göre hazırlandı. Hazırlanan tris sulandırıcısı dört eşit kısma bölünerek, sonuçta kontrol (gliserolsüz), %1 - 2 ve 4

oranlarında gliserol içerecek şekilde araştırma gruplarına gliserol ilaveleri yapıldı. Su banyosu içerisinde (32°C) dört eşit kısma bölünen sperma üzerine, hazırlanan sulandırıcılar 1/5 oranında gruplara yavaşça ilave edildi ve 0. saatteki spermatolojik muayeneleri saptandı. Sulandırılan spermmanın ısı su banyosuna buz atılarak 45 dakika içerisinde 5 °C ye düşürüldü ve buzdolabı içerisinde 96 saat süresince muhafaza edildi. Bu süre içerisinde spermmanın günlük olarak motilite, ölü ve anormal akrozom oranları belirlendi.

İstatistik analiz: Grupların günlük spermatolojik değişimleri arasındaki istatistiki farklılıklar Minitab isimli istatistik programında varyans analiz yardımıyla karşılaştırıldı. Tablo 1'de sunulan taze spermaya ait ortalama spermatolojik değerler 4 köpek'den alınan 3 örneğe (n:12), tablo 2'de araştırma gruplarına ait bildirilen ortalama değerler yapılan 8 tekrarin sonuçlarına göre tespit edildi (n:8).

BULGULAR

Dört köpekten penis masajı yöntemiyle elde edilen taze spermaların orta sekretlerine ait ortalama spermatolojik ve standart sapma değerleri tablo 1 'de verilmiştir.

Farklı gliserol oranları ve kontrol grubuna ait 96 saat süresince sulandırılmış spermada değişen motilite, ölü spermatozoon ve anormal akrozom oranlarına ait değişimler tablo 2 ile grafik 1, 2 ve 3 'te verilmiştir.

Tablo 1. Taze spermmanın orta sekretlerine ait spermatolojik değerler (n:12) ($\bar{X} \pm SD$)

Miktar (ml)	pH	Yoğunluk (x10 ⁶ /ml)	Motilite (%)	Ölü sp. Oranı (%)	Anormal spermatozoon oranı	
					Akrozom (%)	Baş, Orta, Kuyruk (%)
1.2±0.27	6.4±0.13	353.0±45.70	88.3±4.08	1.8±0.51	1.2±0.37	6.9±2.10

X: Ortalama, SD : Standart sapma

Tablo 2. Farklı gliserol oranları ve kontrol grubuna ait sulandırılmış spermaların 96 saat süresince motilite, ölü spermatozoon ve anormal akrozom oranlarına ait değişimler (n:8)($\bar{X} \pm SD$)

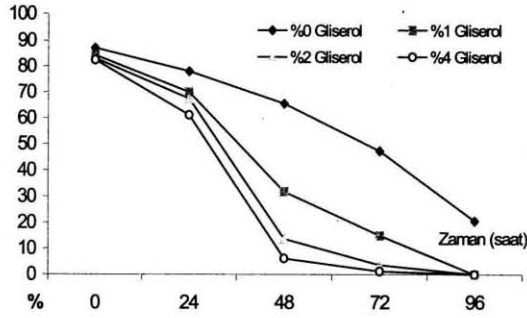
Saat		0	24	48	72	96
		Motilite (%)	Kontrol (%0) 87.1±2.67 ^a	78.1±5.94 ^a	65.6±13.50 ^d	47.5±9.63 ^d
	Gliserol (%1) 84.4±4.17 ^a	70.0±11.30 ^a	31.9±11.63 ^b	15.0±10.35 ^a	0.0±0.00 ^a	
	Gliserol (%2) 83.1±3.72 ^a	67.5±14.40 ^a	13.7±4.43 ^a	3.7±3.53 ^a	0.0±0.00 ^a	
	Gliserol (%4) 82.5±2.67 ^a	61.2±18.08 ^a	6.2±4.43 ^a	1.3±3.53 ^a	0.0±0.00 ^a	
Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir P<0.001						
Ölü sp. Oranı (%)	Kontrol (%0) 2.8±0.84 ^a	7.2±1.33 ^a	10.9±2.21 ^a	14.0±0.63 ^a	19.1±5.27 ^a	
	Gliserol (%1) 3.1±0.82 ^a	8.0±1.28 ^a	12.4±2.30 ^a	16.1±3.46 ^a	21.9±5.23 ^a	
	Gliserol (%2) 3.1±0.86 ^a	8.6±1.15 ^a	13.1±1.82 ^a	17.1±3.21 ^a	22.9±5.30 ^a	
	Gliserol (%4) 3.2±0.92 ^a	9.0±1.13 ^a	15.4±1.86 ^b	19.2±2.99 ^b	27.4±5.06 ^b	
Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir P<0.05						
Anormal Akrozom oranı (%)	Kontrol (%0) 1.8±0.37 ^a	16.7±2.22 ^a	23.6±1.34 ^a	30.4±2.47 ^a	34.5±2.20 ^a	
	Gliserol (%1) 1.9±0.51 ^a	17.5±2.25 ^a	25.1±1.34 ^a	32.7±2.57 ^{ab}	37.2±2.47 ^a	
	Gliserol (%2) 2.0±0.49 ^a	17.9±1.76 ^a	25.9±1.76 ^{ab}	34.2±2.00 ^b	38.6±2.77 ^a	
	Gliserol (%4) 2.0±0.49 ^a	19.4±2.96 ^a	27.7±1.89 ^b	39.4±2.10 ^d	45.8±3.07 ^b	

Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir P<0.01

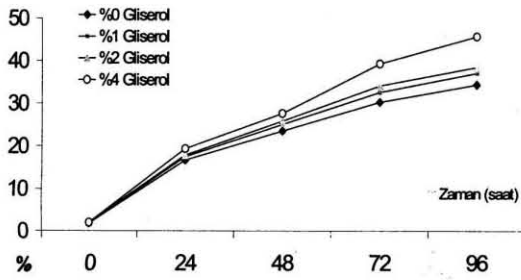
Sulandırılmış spermada motilite açısından en iyi oranın 48. saatten başlayarak kontrol grubu sulandırıcısında olduğu gözlenmiş olup, bu grup ile diğer gruplar arasında istatistiki bir

farklılığın olduğu belirlenmiştir (P<0.001). Ölü spermatozoon oranları yönünden, sulandırılmış spermada en düşük oranın 48. saatten itibaren kontrol, %1 ve %2 oranlarına ait olduğu ve bu

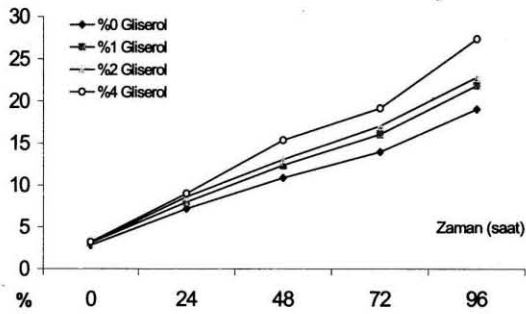
gruplar ile %4 oranında gliserol ilave edilen grup arasında istatistiksel farklılığın olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). En düşük anormal akrozom oranı 96 saat süresince kontrol grubu sulandırıcısında olup, özellikle %4 oranında ilave edilmiş gliserolün akrozom membranları üzerinde önemli hasarlar oluşturduğu belirlenmiştir ($P<0.01$).



Grafik 1. Araştırma gruplarına ait motilite oranlarında gözlenen değişimler



Grafik 2. Araştırma gruplarına ait ölü spermatozoon oranlarında gözlenen değişimler



Grafik 3. Araştırma gruplarına ait anormal akrozom oranlarında gözlenen değişimler

TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan araştırmada, tablo 1'de bildirilen köpeklere ait ortalama spermatozoid değerlerin normal sınırlar içerisinde olduğu belirlenmiştir (6, 19, 21, 22).

Kontrol grubu tris sulandırıcısında, 96 saat süresince günlük olarak belirlenen motilite düşüş oranları, tris sulandırıcısı içerisinde herhangi bir ek katkı maddesi ilave etmeyen kimi araştırmacının bildirdiği motilite değişim oranına benzer bulunmuşken (12), kiminin tespit ettiği değerden düşük (18), ancak diğer farklı bir araştırmacının bulduğu değerden de yüksek olarak tespit edilmiştir (17). Köpek spermasının kısa süreli saklanması, spermanın 1:30 oranında sulandırılmasının, daha düşük sulandırma oranlarına göre spermatozoon canlılığı ve motilitesini daha uzun bir süre koruyabildiği bildirilmiştir (8). Yapılan araştırmada kontrol grubu tris sulandırıcısı ile yukarıdaki çeşitli araştırmacıların bildirdikleri sonuçlar arasında tespit edilen motilite oranlarındaki farklılıklara muhtemelen sperma sulandırma oranları ve sulandırıcı içerisinde kullanılan doğal ve kimyasal madde kompozisyonundaki değişiklikler, sulandırılan sperma ısısının 5°C 'ye düşürülme hız ve tekniğinde kullanılan farklılıklar etkili olmuş olabilir.

Araştırma da kontrol ve değişik oranlardaki gliserol grupları arasında motilite ($P<0.001$) ve ölü spermatozoon ($P<0.05$) oranları açısından 48. saatten itibaren başlayarak istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir (Tablo 2, Grafik 1 - 2). Sunulan çalışmada sulandırıcı içerisine ilave edilen tüm gliserol miktarlarının 48. saatten itibaren motiliteyi baskıladığı, %4'lük gliserol ilavesinin ise spermatozoon canlılığı üzerine toksik etki yaptığı belirlendi. Foote (7) motilite açısından sperma sulandırıcısı içerisine eklediği %8'lük gliserol oranını %4'den daha zararlı olduğunu bulmuştur. Proviencie ve ark (17)'i sulandırılmış spermanın kısa süreli saklanması %6'lük gliserol oranının motiliteyi baskıladığını, ancak %3'lük oranın ise herhangi bir zararlı etkisini tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Sunulan araştırmada tespit edilen motilite oranları Foote (7)'a benzer, ancak Proviencie ve ark (17)'nin %3 oranında ilave ettikleri araştırma grubundan da düşük bulunmuştur. Bu farklı sonuçlar muhtemelen, Proviencie ve ark (17) tarafından gliserollü sulandırıcının, spermanın 5°C 'ye düşürülmesinden sonra ilave edilmesine bağlı olarak şekillenmiş olabilir. Çünkü Critser ve ark (3)'ü spermanın uzun süreli saklanması, sulandırıcıya -5°C 'de gliserol ilavesinin, 25°C 'de yapılan ilaveye göre çözüm sonrası 24. saatteki motilite üzerine önemli koruyucu etkileri olduğunu saptamışlardır. Tablo 2 ve Grafik 3'te gözlenebildiği gibi, akrozom anormalitesi yönünden 48. saatten itibaren özellikle %2 ve %4 gliserol oranlarında önemli istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir ($P<0.01$). Sulandırıcı içerisindeki gliserol oranı yükseldikçe 48. saatten başlayarak anormal akrozom oranının da arttığı tespit edilmiştir. Değişik araştırmacılar gliserolün toksik olmayan seviyelerde eklenmesinin hücrelerin intraselüller ve ekstraselüller çözelti yoğunluğunu (15) ve membranlarını koruduğunu (11, 25) bildirmişlerdir. Yapılan araştırmada belirlenen, gliserol oranlarındaki yükselme ile akrozom membranlarında ortaya çıkan genel anomalite

artışına, muhtemelen spermatozoonlara ait intraselüller ve ekstraselüller çözelti yoğunluk dengelerinin ve membranlarının gliserolden olumsuz yönde etkilenmiş olmasından kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak köpek spermasının kısa süreli saklanması tris sulandırıcısı içerisine ilave edilen düşük gliserol oranları ve kontrol gruplarına ait spermatolojik özellikler karşılaştırıldığında, sulandırıcıya ilave edilen tüm gliserol miktarlarının motiliteyi baskıladığı, %4 oranında ilave edilen gliserol oranının spermatozoon canlılığı üzerine daha toksik etkili olduğu ve akrozom membran hasarlarını artırdığı saptandı.

KAYNAKLAR

- 1-Almquist JO (1959)** : Efficient, low cost results using milk - glycerol diluent. A.I. Digest., 7(8) : 11-14.
- 2-Busch W., Löhle K. Und Peter W (1991)**:In : Künstliche Besamung bei Nutztieren. Ed by W Busch. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- 3-Critser JK., Arneson BW., Huse-Benda AR., Ball GD and Aaker DV (1988)**: Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. Fertility and Sterility., 50 : 2, 314-320.
- 4-Dott HM and Foster GC (1972)**: A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live/dead' stain. J. Reprod Fertil., 29 : 443-445.
- 5-Evans G and Maxwell WMC (1987)**: Handling and Examination of Semen In : Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Ed by WMC Maxwell., 11: 93-106. Sydney.
- 6-Faulkner LC and Pineda MH (1983)**:Artificial Insemination. In :Veterinary Endocrinology and Reproduction. Ed by LE Donald. 11: 330-349. Third Edition, Philadelphia.
- 7-Foote RH (1964)**: The Effects of Electrolytes, Sugars, Glycerol and Catalase on Survival of Dog Sperm Stored in Buffered-Yolk Mediums. Am. J. Vet. Res., 25:104, 32-36.
- 8-Foote RH (1964)**: The influence of frequency of semen collection, fractionation of the ejaculate, and dilution rate on the survival of stored dog semen. The Cornell Vet., 54: 89-97.
- 9-Foote RH and Bratton RW (1960)**: Survival of bovine spermatozoa stored at 5 and 25 °C in extenders containing varying levels of egg yolk, glucose, glycine, glycerol, citrate, and other salts. J. Dairy Sci., 43 : 1322- 1329.
- 10-Foote RH., Gray LC., Young DC and Dunn HO (1964)**: Fertility of bull semen stored up to for days at 5 °C in 20% egg yolk extenders. J. Dairy Sci., 43 : 1330-1334.
- 11-Garner DL (1991)**: Artificial Insemination. In :Reproduction in Domestic Animals., Ed by PT Cupps, 7, 251-270. Academic Press Inc, San Diego.
- 12-Günzel A.R (1986)**: Semen collection, evaluation and preservation and artificial insemination in the dog. Tierärztliche Praxis., 14(2)275-282.
- 13-Jones AR., Chantrill LA and Cokinakis A (1992)**: Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. J. Reprod. Fert., 94, 129-134.
- 14-Jones AR and Gillan L (1996)**: Metabolism of glycerol 3-phosphate by mature boar spermatozoa. J. Reprod. Fert., 106, 321-327.
- 15-McGann LE (1978)**: Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. Cryobiology., 15 : 382.
- 16-Philips PH (1939)**: Preservation of bull semen. J. Biol. Chem., 130 : 415.
- 17-Province CA., Amann RP., Picket BW and Squires EL (1984)**: Extender for reservation of Canine and Equine spermatozoa at 5 °C. Theriogenology., 22, 4: 409 - 415.
- 18-Rota A., Ström B and Linde - Forsberg C (1995)**: Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. Theriogenology., 44: 885-900.
- 19-Setchell BP (1991)**: Male reproductive Organs and Semen. In :Reproduction in Domestic Animals. Ed. by PT Cupps. 6: 221-278. Academic Press Inc, San Diego.
- 20-Sharma KB and Tomar NS (1984)**: Studies on the effect of glycerol on the keeping quality of bovine semen at 5 °C. Indian Vet. J., 496-500.
- 21-Smith FO (1989)**: Examining male dogs and cats for breeding soundness. Vet. Med., 594-603.
- 22-Stockner PK and Bardwick C (1991)**: The relationship of semen parameters to fertility in the dog. Canine Practice., 16, 2: 15-23.
- 23-Tekin N (1994)**: Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. In :Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Ed by E Alaçam, 7: 69-79. I. Baskı, Konya.
- 24-Tekin N., İzgür H ve Özyurt M (1987)**: Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatolojik özellikler üzerinde araştırmalar. Selçuk Üniv. Vet. Fak. Dergisi., 3,1:83-95.
- 25-Watson PF (1979)**: The preservation of semen in mammals. In :Oxford Reviews of Reproduction and Biology. 1:283-351. Oxford Univ Press, Oxford.