

KISA SÜRELİ TEKE SPERMASININ SAKLANMASINDA FARKLI ŞEKERLERİN SPERMA KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

INFLUENCE OF SPERM QUALITY OF DIFFERENT SUGARS DURING SHORT-TERM STORAGE OF GOAT SEMEN

Çiğdem Çebi Şen¹, Recai Kulaksız²

¹Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme Ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Şanlıurfa

²Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme Ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Balıkesir

Yazışma Adresi:

Çiğdem Çebi Şen

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana bilim Dalı, Şanlıurfa - Türkiye

E posta: cigdemcebi@hotmail.com

Kabul Tarihi: 12 Aralık.2017

doi: [10.5505/bsbd.2017.47560](https://doi.org/10.5505/bsbd.2017.47560)

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi

ISSN: 2146-9601

e-ISSN: 2147-2238

bsbd@balikesir.edu.tr

www.bau-sbdergisi.com

ÖZET

GİRİŞ ve AMAÇ: Bu çalışmanın amacı, Ankara tekesi spermasının kısa süreli saklanması sperm sulandırıcılarına katılan farklı miktarlardaki farklı şekerlerin (glukoz ve fruktoz) ve yumurta sarısının teke sperması kalitesi üzerine etkinliğinin belirlenmesidir.

YÖNTEM ve GEREÇLER: 4 Ankara tekesinden suni vajen yardımıyla alınan ejakulatlar 8 eşit kısma ayrılarak farklı dozlarda glukoz ve fruktoz içeren ve yumurta sarısı içermeyen yağsız süt tozu sulandırıcısı ile sulandırıldı. Sulandırılan sperma örnekleri 0.25 ml'lik payetlere çekilerek +4°C'de 0, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde spermatozoa motilitesi yönünden muayene edildi.

BULGULAR: Yumurta sarısı içermeyen grubun kısa süreli saklama sonucu motilite değerlerindeki düşüşün özellikle ilk 24 saat içerisinde hızla gerçekleştiği gözlemlendi. Farklı dozda glukoz veya fruktozun sulandırıcıya eklenmesi ise spermatozoa motilitesi bakımından 0-96 saatler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık oluşturmadı.

TARTIŞMA ve SONUÇ: Sonuç olarak teke spermasının kısa süreli saklanması için süt bazlı sulandırıcılara şeker olarak eklenen glukoz veya fruktozun kullanımı arasında bir fark yoktur.

Anahtar Kelimeler: Glukoz, fruktoz, teke sperması, yumurta sarısı

SUMMARY

INTRODUCTION: The purpose of the present study is to determine the effect of different sugars (glucose and fructose) and egg yolks effect on the quality of the Ankara goat semen.

METHODS: Ejaculates collected from artificial vagina from 4 Ankara goats were divided into 8 equal parts. Sperm samples containing glucose and fructose at different doses and containing no egg yolk were diluted with skimmed milk. Semen samples were withdrawn with 0.25 ml straws and spermatozoa motility was examined at 0, 24, 48, 72 and 96 hours at +4 °C.

RESULTS: The decrease in the short term storage motility values of the group without egg yolks observed especially during the first 24 hours. The addition of different doses of glucose and fructose to the diluent, spermatozoa motility did not make a statistically significant difference between the 0-96 hours.

DISCUSSION AND CONCLUSION: As a result, there is no difference between the use of glucose or fructose added as a milk-based diluent sugar for short-term storage of goat semen.

Keywords: Glucose, fructose, goat semen, egg yolk

GİRİŞ

Ankara keçisi popülasyonu 1980'li yıllardan sonra çok ciddi düşüş göstermiş ve 4 milyon baş olan Ankara keçisi günümüzde 100 bin başa kadar gerilemiştir. Ancak son yıllarda tarım bakanlığı, üniversite ve damızlık koyun keçisi yetiştirici birliği ve Ankara büyükşehir belediyesinin katkılarıyla Ankara keçisi sayısı yeniden bir yükselişe geçmiş ve ilgi odağı olmaya başlamıştır. Özellikle Ankara keçisinin gen kaynağını koruma programları, sperma ve embriyosunu dondurarak koruma altına alma ve üretimini artırma çalışmaları devreye girmiştir. Teke spermasının dondurulmasında kısmen başarılı denemeler elde

edilmesine rağmen, dondurulmuş teke spermasıyla yapılan suni tohumlama uygulamalarından elde edilen gebelik oranları henüz tatmin edici düzeyde değildir. Dondurulmuş teke sperma ile yapılan tohumlamalardan sonra ortaya çıkan düşük gebelik oranlarından dolayı, 4-5 °C arasında kısa süreli olarak saklanan spermanın suni tohumlamada kullanılması, keçi yetiştiriciliğinde bir teknik haline gelmiştir¹. Günümüzde teke spermanın kısa süreli saklanması için yumurta sarısı ile desteklenmiş yağsız süt tozu, tris ve sodyum sitrat bazlı sulandırıcılar yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar tarafından teke spermasının saklanması yumurta sarısının, spermatozoa'nın soğuk şokuna karşı korunmasında sperma sulandırıcılarına katılması gerekli olan

etkili bir ajan olduğu kabul edilirken², diğer araştırmacılar ise yumurta sarısının teke sperması için toksik olduğunu bildirmişlerdir^{3,4}. Yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla ilişkilendirilen problem, bulboüretal bez sekresyonunda bulunan ve seminal plazmada yer alan, yumurta sarısı koagüle edici özellik taşıyan enzime (EYCE) bağlanmıştır⁵. Sperma sulandırıcılarına eklenen şekerler spermatozoonlar için enerji kaynağı oluşturmanın ötesinde sulandırıcının osmotik basıncının sağlanmasında görev yaparlar ve kriyopektan özelliklerinden yararlanılmaktadır. Şekerler spermatozoanın membran bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynarlar. Teke sperması, solunum için fruktoz, glukoz, laktöz ve diğer şekerleri kolayca kullanabilmesine rağmen, teke seminal plazmasında en büyük molar konsantrasyona sahip olan fruktozun glikolizis için birincil substrat olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle fruktozu sulandırıcı içine dahil etmek makuldür⁶. Var olan çalışmanın amacı, sperma sulandırıcısına katılan farklı miktarlardaki farklı şekerlerin (glukoz ve fruktoz) ve yumurta sarısının teke spermasının kısa süreli saklanması spermatozoa motilitesi üzerine koruyucu etkilerini karşılaştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada 1,5-2 yaşlı 4 baş Ankara tekesi kullanıldı. Tekelerin bakım ve beslenmesi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde standart yetiştirme koşullarında yapıldı. Tekelerden sperma Ekim-Kasım aylarında suni vajen yardımıyla haftada iki kez olmak üzere alınmıştır. Toplanan sperma örneklerinden, spermatozoa motilitesi %80 ve üzerinde olan ejakulatlar sulandırma işlemi için kullanıldı. 4 farklı tekeeden elde edilen spermalar deney tüpünde birleştirildi. Daha sonra sperma 8 eşit kısma ayrılarak sulandırma işlemi gerçekleştirildi. Bu çalışmada spermaların sulandırılmasında temel sulandırıcı olarak yağsız süt tozu kullanıldı. Pooling yapılan ve 8 eşit parçaya bölünen sperma örnekleri, her biri farklı dozlarda glukoz (0.5 g ve 1 g) ve fruktoz (0.5 g ve 1 g) içeren ve yumurta sarısı içermeyen yağsız süt tozu sulandırıcısı ile 1:10 sperma:sulandırıcı olacak şekilde sulandırıldı (Tablo 1). Sulandırmayı takiben 37°C 5 dakika inkübe edilen sperma örnekleri 0.25 ml'lik payetlere çekildi ve +4°C'ta muhafaza edildi. Daha sonra farklı şeker içeren, yumurta sarısı içermeyen veya kontrol grubuna ait örnekler, 0, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde spermatozoa motilitesi yönünden muayene edildi. Sperma motilitesi 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta 40'lük objektif kullanılarak değerlendirildi. 4 tekenin toplam 32 ejakulatının spermatozoa motilite oranlarının ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanmıştır. İstatistiksel analizde "Wilcoxon T Testi" kullanılmıştır.

Tablo1. Kullanılan sperma sulandırıcıları

Kontrol A	10 g yağsız süt tozu, 100 IU/ml kristal penisilin, 1mg/ml streptomisin ve % 10 yumurta sarısı kullanıldı.
Sulandırıcı B	10 g yağsız süt tozu, 0.5 g glukoz, 100 IU/ml kristal penisilin, 1mg/ml streptomisin kullanıldı. % 10 yumurta sarısı eklenmedi.
Sulandırıcı C	10 g yağsız süt tozu, 100 IU/ml kristal penisilin, 1mg/ml streptomisin ve % 10 yumurta sarısı kullanıldı.
Sulandırıcı D	10 g yağsız süt tozu, 0.5 g glukoz, 100 IU/ml kristal penisilin, 1mg/ml streptomisin ve % 10 yumurta sarısı kullanıldı.
Sulandırıcı E	10 g yağsız süt tozu, 0.5 g fruktoz, 100 IU/ml kristal penisilin, 1mg/ml streptomisin ve % 10 yumurta sarısı kullanıldı.
Sulandırıcı F	10 g yağsız süt tozu, 1 g glukoz, 100 IU/ml kristal penisilin, 1mg/ml streptomisin ve % 10 yumurta sarısı kullanıldı.
Sulandırıcı G	9 g yağsız süt tozu, 1 g fruktoz, 100 IU/ml kristal penisilin, 1mg/ml streptomisin ve % 10 yumurta sarısı kullanıldı.

BULGULAR

Teke spermasının kısa süreli saklanması (96 saat süresince) şeker ilavesinin spermatozoa motilitesi üzerine etkili olduğu görüldü. Şeker katılmayan grupta spermatozoa motilitesindeki gözlemlenen hızlı düşüş ilk 24 saat içerisinde gerçekleşti. Tablo 2'de spermatozoa motilitesi üzerine şeker ilavesinin etkisi gösterildi. Sulandırıcıda şeker olarak farklı dozda glukoz veya fruktoz kullanılması sonrası spermatozoa motilitesi bakımından 0-96. saatler arasında istatistiksel olarak önemli farklılık oluşmadığı saptandı. Farklı şeker eklenmesi spermatozoa motilitesi üzerine etkili değil iken, şeker katılmayan gruptaki motilite değerlerindeki düşüş çok hızlı gerçekleşti. Bununla birlikte yumurta sarısı içermeyen grubun kısa süreli saklama sonucu motilite değerlerinin kontrol grubuna göre oldukça düşük olduğu (P<0,05) ve özellikle ilk 24 saat içerisinde elde edilen düşüşün hızla gerçekleştiği gözlemlendi (Tablo 2). Tüm gruplardaki motilite değerlerindeki düşüş ilk 24. saate kadar çok hızlı olurken, 48, 72 ve 96. saatlerdeki düşüş daha yavaş ve stabildi.

Tablo 2. Farklı sulandırıcılarda 4°C'de saklanan teke spermasındaki günlük ortalama ($\bar{X} \pm Sx$) spermatozoa motilite değerleri

Saat	Spermatozoa motilitesi (%)						
	$\bar{X} \pm Sx$						
	A	B	C	D	E	F	G
0	87±2.1 ^{Aa}	85±2.5 ^{Aa}	85±3.5 ^{Aa}	85±3.2 ^{Aa}	85±3.5 ^{Aa}	85±2.5 ^{Aa}	85±3.0 ^{Aa}
24	30±1.8 ^{Ba}	25±3.6 ^{Ba}	50±2.7 ^{Bb}	75±2.6 ^{ABc}	70±4.2 ^{Bc}	70±3.0 ^{Bc}	65±2.0 ^{Bd}
48	20±2.6 ^{Ba}	20±2.1 ^{Ba}	45±2.2 ^{Bb}	70±2.5 ^{Bc}	65±3.5 ^{Bcc}	65±2.0 ^{Bcc}	60±2.5 ^{Bcd}
72	20±2.0 ^{Ba}	20±2.5 ^{Ba}	40±2.0 ^{Bcb}	65±2.5 ^{Bcc}	60±2.9 ^{Cc}	60±2.8 ^{Cc}	55±2.2 ^{Cd}
96	15±2.5 ^{Ca}	15±1.5 ^{Ca}	35±2.4 ^{Cb}	55±2.8 ^{Cc}	50±2.3 ^{Cc}	50±2.2 ^{Cc}	50±2.0 ^{Cc}

A-C : aynı sütünde farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli (P<0.05)

a-h : aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli (P<0.05)

TARTIŞMA

Spermatozoa motilitesinin kontrolü büyük oranda, ATP'nin kullanımına bağlıdır. Spermatozoa ATP üretmek için seminal plazmada, dişi genital sisteminde veya sperma sulandırıcılarında bulunan ekzojen enerji kaynaklarını (fruktoz, laktat, pirüvat veya glukoz gibi) metabolize eder. Sulandırıcının ozmotik basıncını ayarlayan ve kriyoprotektan olarak etki gösteren şekerler inkübasyon sırasında spermatozoonlar için enerji kaynağıdır⁷. Başlangıçta şekerler, sperma sulandırıcılarına spermatozoonlar için hazır metabolize edilebilir maddeler olarak düşük oranlarda katılırdı. Sulandırıcıdaki şeker oranının yükseltilmesinin spermanın dondurulması ve çözülmesi sonucu spermatozoa motilitesi oranını artırdığının belirlenmesi üzerine şekerlerin önemi artmıştır. Spermatozoa enerji kaynaklarını esasen glikolizden başka daha az olarak mitokondride oksidatif fosforilizasyondan da sağlar. Fruktozun ejakula olan spermatozoa için önemli bir enerji kaynağı olduğu düşünülmekte ve birçok memeli türünün seminal plazmasında glikoz ile birlikte bulunmaktadır. Spermanın başlıca enerji kaynağı fruktoz olmasına rağmen sulandırıcılara glikoz ve mannoz ilave edildiğinde spermatozoonlar bu şekerleri de metabolize edebildiği bildirilmiştir. Birçok türde, metabolize edilebilir enerji ve fertilite potansiyeli bakımından glukoz ve fruktozun gametler üzerine etkileri araştırılmış fakat etkileri türler arasında farklılık göstermiştir⁸. Bu çalışmada sperma sulandırıcısına şeker eklenmemesi spermatozoa motilitesini hızla düşürürken, 0.5 g ve 1 g dozda glikoz ve fruktoz eklenmesi spermatozoa motilitesindeki düşüşü yavaşlatmıştır. Mann ve Lutwak-Mann (1981) boğa spermasının glikoz gibi farklı şekerleri laktik aside

dönüştürerek spermatozoa motilitesini koruduğunu bildirmiştir. Glikozun, teke spermatozoaları için normal fizyolojik bir şekilde işlev yapabilmesi için gerekli olan enerji substratı olarak mükemmel bir şeker olduğu öne sürülmüştür^{10,11,12}. Fakat var olan çalışmada spermatozoa motilitesi açısından farklı iki şekerin (glukoz and fruktoz) farklı iki konsantrasyonunun spermaya eklenmesi bir fark oluşturmamıştır. Var olan çalışmaya paralel olarak, Ponglowhapan ve ark. (2004) tarafından köpek spermasına glukoz ve fruktozun farklı konsantrasyonlarının eklenmesi sperma kalitesini etkilemediğini bildirmişlerdir. Önceki çalışmalarda glikozun Boer teke spermatozoa motilitesi üzerinde daha iyi etki ettiği rapor edilmiştir¹⁴. Var olan çalışmada ise glukoz fruktozdan daha üstün bulunmamıştır. Şekerlerin farklı türlerini içeren sulandırıcılar ile dilüsyonunu izleyen 96 saat sonra gruplar arası spermatozoa motilitesi bakımından fark bulunamamıştır. Bu çalışmada, spermatozoa motilitesi ilk 24 saat boyunca yüksek kaldı ve daha sonra, beklendiği gibi, saklama süresince spermatozoa motilitesi azaldı. Tüm gruplarda spermatozoa motilitesi zaman geçtikçe azalmıştır. Spermatozoa motilitesindeki azalma, ATP'ye bağımlı sodyum-potasyum pompasının sıcaklık hassasiyeti ve iyon sızıntısına bağlı olduğu düşünülmektedir. Hangi şekerin bir sulandırıcıya dahil edilmesi seçimi, kimyasal işlevselliğine bağlı olabilir. Bu çalışmadaki sonuçlara dayanarak, glukoz veya fruktoz (0.5 gr veya 1g) ihtiva eden süt bazlı bir sulandırıcı içinde +4°C'de 96 saat saklanan teke spermasını kullanmak mümkündür. Süt bazlı sulandırıcılarda glukoz ya da fruktoz eklenmesi sonucu spermatozoanın bireysel motilitesini 72 saatin üzerinde gösterdiği belirlenmiştir.

SONUÇ

Sonuç olarak teke spermasının kısa süreli saklanması için süt bazlı sulandırıcılara şeker olarak eklenen glukoz veya fruktozun kullanımı arasında bir fark olmadığı belirlendi.

KAYNAKLAR:

1. Ax RL, Dally MA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. Semen Evaluation. In: *Reproduction in Farm Animals*, Hafez, B. and E.S.E. Hafez (Eds.). 7th Edn. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, ISBN-13: 978-0683305777, pp: 365-375. 2000.
2. Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 2003;69,1245-1250.
3. Iritani A, Nishika WA. Studies on the egg yolk coagulating factors in goat semen: II properties of the coagulating factor and influential conditions for foagulation. In: *Proceedings of Silver Jubilee Laboratory of Animal Husbandry, Kyoto University*, 97-104, 1961.
4. Sawyer DE, Brown DB. The use on an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reprod Toxicol*, 1995;9, 351-357.
5. R Kulaksız, A Daşkın. Teke spermasının kısa ve uzun süreli saklanması. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 2007;78(4),51-56.
6. Pellicer-Rubio MT, Magallon T, Yves. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biology of Reproduction*, 1997;57,1023-1031.
7. Ahmad E, Aksoy M. Trehalose as a cryoprotective agent for the sperm cells: A mini review. *Animal Health, Prod. and Hyg*, 2012;1(2),123-129.
8. Ferdinand N, Thomas TT, Augustave K, Henry DF, Femand T, Etienne PT. Effects of Buck Age, Storage Duration, Storage Temperature and Diluent on Fresh West African Dwarf Buck Semen. *J Reprod Infertility*, 2012;3(3),58-66.
9. Mann T, Lutwak-Mann C. Examination of spermatozoa and isolated structural components. In: Mann, T. and Lutwak-Mann, C. (Eds) *Male reproductive function and semen*. Berlin Heidelberg, New York, pp . 63-69, 1981.
10. Corteel JM. Viabilite' des spermatozoid de bouc conserves et congele's avec ou sans leur plasma seminal: effect du glucose (viability of spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect). *Ann Biol Anim Biochem Biophys*, 1974;14, 741-745.
11. Fukuhara R, Nishikawa Y. Effects of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility of goat spermatozoa. *Jpn J Zotech Sci*, 1973;44,266-270.
12. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res*, 2006;63(3),215-225.
13. Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Forsberg CL. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 2004;62(8),1498-1517.
14. Naing SW, Wahid H, Mohd Azam K, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, 2010;122(1-2),23-28.