

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YIKANMIŞ ANKARA TEKESİ SPERMASININ BOĞA VE KOÇ
SEMİNAL PLAZMASI EKLENMİŞ SULANDIRICIYLA
DONDURULMASI**

Umut Çağın ARI

**DÖLERME VE SUN'İ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali DAŞKIN**

2006 – ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YIKANMIŞ ANKARA TEKESİ SPERMASININ BOĞA VE KOÇ
SEMİNAL PLAZMASI EKLENMİŞ SULANDIRICIYLA
DONDURULMASI**

Umut Çağın ARI

**DÖLERME VE SUN'İ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali DAŞKIN**

**Bu tez, TÜBİTAK TOVAG tarafından 105 O 050 proje numarasıyla
desteklenmiştir.**

2006 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Dölerme ve Suni Tohumlama AD Doktora Programı
Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: / /2006

İmza

Ünvanı, Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Ünvanı, Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör

İmza

Ünvanı, Adı ve Soyadı

Üniversitesi

İmza

Ünvanı, Adı ve Soyadı

Üniversitesi

İmza

Ünvanı, Adı ve Soyadı

Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekil ve Çizelgeler	viii
Resimler	ix
1.GİRİŞ	1
1.1. Tekelerde Dölverimi	1
1.1.1. Tekelerde Seksüel Olgunluk ve Davranışlar	1
1.1.2. Sperma Üretimi	2
1.1.3. Seksüel Aktivite ve Sperma Üretiminde Mevsimsel Değişimin Etkisi	2
1.1.4. Sperma Üretiminin Kontrolü	4
1.1.4.1. Fotoperiyodik Uygulama	4
1.1.4.2. Termal Çevre	4
1.1.4.3. Sosyal Çevre ve İdari Koşullar	5
1.1.4.4. Sperma Almanın Sıklığı ve Yöntemi	5
1.1.4.5. Dölerimsel Performansın Belirlenmesi	6
1.1.5. Teke Spermasının Saklanması	7
1.1.5.1. Yumurta Sarısı Koagule Edici Enzim (EYCE)	8
1.1.5.2. Süt ile Etkileşen Proteinler	8
1.1.5.3. Tekelerde Sperma Saklama Öncesi Seminal Plazmanın Uzaklaştırılmasının Önemi	10
1.1.5.4. Kısa Süreli Saklama	12
1.1.5.5. Teke Spermasının Uzun Süreli Saklanması	13
1.1.5.5.1. Teke Spermasının Saklanması Kullandığı Sulandırıcılar ve Kriyoprotektanlar	15
1.1.5.5.2. Teke Spermasının Dondurulma Yöntemleri	16
1.1.5.5.3. Spermanın Çözülmesi	17
1.1.5.5.4. Uzun Süreli Saklamanın Başarısını Etkileyen Faktörler	18
1.1.5.5.5. Teke Spermasının Uzun Süreli Saklanması Zamanın Önemi	18
1.1. Seminal plazma	20
1.1.1. Seminal plazmanın kaynağı (Eklenti bezleri)	20
1.1.2. Seminal plazmanın içeriği	22
1.1.3. Seminal Plazmanın Spermadaki Payı	23
2.GEREÇ VE YÖNTEM	25
2.1. Hayvan Materyali	25
2.2. Hayvanların Bakım ve Beslenmesi	25
2.3. Boğa ve Koç Seminal Plazmasının Eldesi	25
2.4. Çalışmada Kullanılan Sulandırıcı ve Yıkama Solüsyonları	26
2.5. Spermanın Alınması	27
2.6. Ankara Tekesi Spermasının Seminal Plazmasından Ayrılması, Sulandırılması ve Elde Edilen Gruplar	28
2.7. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	33
2.8.Spermatolojik Değerlendirme Parametreleri	34
2.8.1. Miktar	34
2.8.2.Motilite	34
2.8.3.Ölü-Canlı Spermatozoa Oranı	34
2.8.4.Anormal Spermatozoa Oranı	36
2.8.5.Yoğunluk	38
2.8.6.HipoOsmotik Swelling (HOS) Test	39
2.9. İstatistik Analiz	41
3.BULGULAR	42
3.1. Taze Spermanın Spermatolojik Parametreleri	42
3.2. Çalışma Gruplarının Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreleri	43
3.2.1. Motilite	43

3.2.2.Ölü Spermatozoa Oranı	46
3.2.3. Anormal Spermatozoa Oranı	49
3.2.4.HipoOsmotik Sweling (Şişme) (HOS) Test Oranı	52
3.2.5. Akrozoma Bağlı Anormal Spermatozoa Oranı	55
4.TARTIŞMA	58
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	66
ÖZET	68
SUMMARY	70
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	77

ÖNSÖZ

Suni tohumlama hayvan türlerinde genetik ilerlemenin sağlanabilmesi amacıyla kullanılan en önemli ve en basit yöntemdir. Çünkü, verimsel özellikleri bakımından seçilmiş bir kaç erkek hayvandan bir yıl içinde elde edilecek sperma ile binlerce dişinin gebe bırakılabilmesi söz konusudur. Embriyo transferiyle bile olsa, bir dişiden bir yılda üretilebilecek yavru sayısı sınırlıdır.

Arap çöllerinde yaşayan Bedevilerin Arap Atlarının yetiştirmesinde suni tohumlamayı kullandığına dair söylentiler olsa da suni tohumlama kullanımının dikkatli bir şekilde dökümente edildiği belgeler, İtalyan fizyolojist olan Spallanzani'nin bu yolla beagle ırkı yavru köpekler elde ettiği 1780 yılına kadar uzanır. Rusya'da 1900'lü yılların başında ise bu yöntem çiftlik hayvanlarında kullanılmış kısa bir süre sonra da Japonlar aynı yöntemle çiftlik hayvanlarından yavrular elde etmişlerdir. Cumhuriyetimizin ilk yıllarında, hayvancılığın geliştirilmesine yönelik politikalarla beraber, suni tohumlama uygulaması kısa süre sonra ülkemize getirilmiş ve bilinçli bir şekilde kullanımı sağlanmıştır.

Suni tohumlamanın yaygınlaşmasındaki en önemli unsur verimsel ve tip özellikleri yönünden seçilmiş erkek hayvanların spermalarının başarılı bir şekilde dondurulması olmuştur. Spermanın başarılı bir şekilde dondurulması kryoprotektif ajanlar olarak nitelendirilen donmanın olumsuz etkilerini azaltma yeteneğine sahip bileşiklerin kullanılmasıyla mümkün gözükmektedir (1950 Polge). Bu unsurlardan birisi belki de en önemlisi yumurta sarısıdır. Böylelikle özellikle sığır yetiştiriciliğinde suni tohumlama en önemli unsurlardan birisi haline gelmiştir.

Suni tohumlamanın yararlarına kabaca bakacak olursak:

- 1)Genetik ilerlemeyi hızlandırır ayrıca gen havuzları diyebileceğimiz sperm bankalarının oluşturulmasını sağlar,
- 2)Venereal hastalıkların kontrolünü olanaklı kılar,
- 3)Doğru ve ulaşılabilir yetiştirme kaydı oluşturulmasına büyük katkıda bulunur,
- 4)Ekonomiktir

Ülkemizde gittikçe yetiştiriciliği ve dolayısıyla sayısı azalan Ankara Keçisinin yetiştiriciliğinin yaygınlaştırılması suni tohumlama uygulamalarıyla mümkün görülmektedir. Suni tohumlamanın yaygınlaştırılmasındaki en önemli unsur spermanın dondurularak uzun süreli saklanmasıdır. Bu noktada en önemli engel, teke spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcılara katılması zorunlu yumurta sarısının teke seminal plazması ile olan olumsuz etkileşimidir. Bu çalışmayla Ankara Tekesi spermasının uzun süreli saklanmasında seminal plazmanın ayrılmasının ve sulandırıcılara yumurta sarısı ile etkileşim göstermeyen türlere ait seminal plazmanın katımının etkileri araştırılmış; böylelikle elde edilen verilerin bu kapsamda bir referans olması arzulanmıştır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali DAŞKIN'a, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Necmettin TEKİN'e ayrıca Anabilim Dalının tüm akademik ve teknik personeline özellikle de saha çalışmalarında emeğini esirgemeyen Veteriner Hekim Recai KULAKSIZ'a, çalışmamın istatistik değerlendirmesinde katkıda bulunan Sayın İ. Safa GÜRCAN'a, hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu dönemde de bana her zaman destek olan anneme ve babama şükranlarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

BSP	Boğa Seminal Plazması Proteini
BUSgp60	Bulboürethral Seksekresyon gliko-protein (60kDa) (SBUIII)
EYCE	Yumurta Sarısı Koagule Edici Enzim
GPC	Gliseril Fosforil Kolin
GSP	Teke Seminal Plazması Proteini
kDa	Kilodalton
g	Yerçekimi ivmesi ($9,8 \text{ m/sn}^2$)
TB	Sperm-TALP ile yıkanmış ve boğa seminal plazması içeren sulandırıcıyla dondurulmuş Ankara Tekesi sperması (1. Grup)
TK	Sperm-TALP ile yıkanmış ve koç seminal plazması içeren sulandırıcıyla dondurulmuş Ankara Tekesi sperması (2. Grup)
T	Sperm-TALP ile yıkanmış ve seminal plazma içermeyen sulandırıcıyla dondurulmuş Ankara Tekesi sperması (3. Grup)
RB	Ringer ile yıkanmış ve boğa seminal plazması içeren sulandırıcıyla dondurulmuş Ankara Tekesi sperması (4. Grup)
RK	Ringer ile yıkanmış ve koç seminal plazması içeren sulandırıcıyla dondurulmuş Ankara Tekesi sperması (5. Grup)
R	Ringer ile yıkanmış ve seminal plazma içermeyen sulandırıcıyla dondurulmuş Ankara Tekesi sperması (6. Grup)
C	Yıkama işlemi gerçekleştirilmeden ve seminal plazma içermeyen sulandırıcıyla dondurulmuş Ankara Tekesi sperması (7. Grup-Kontrol)

ŞEKİL VE ÇİZELGELER

Şekiller

Şekil 2.1. Çalışma içindeki grupların oluşturulması

Şekil 3.1. Araştırma gruplarında spermatolojik parametrelerin genel görünümü

Çizelgeler

Çizelge 1.1. Teke, boğa ve koç seminal plazmalarının içeriği

Çizelge 3.1. Ankara Tekesi miks spermalarının belirlenen spermatolojik parametreler.

Çizelge 3.2. Çözüm sonu motilite oranları

Çizelge 3.3. Talp yıkama alt gruplarının çözüm sonu motiliteleri ve farkların önemliliği

Çizelge 3.4. Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu motiliteleri ve farkların önemliliği

Çizelge 3.5. Talp ve Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu motilite oranları farkının önemliliği

Çizelge 3.6. Çözüm sonu ölü spermatozoa oranları

Çizelge 3.7. Talp yıkama alt gruplarının çözüm sonu ölü spermatozoa oranları ve farkların önemliliği

Çizelge 3.8. Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu ölü spermatozoa oranları ve farkların önemliliği

Çizelge 3.9. Talp ve Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu ölü spermatozoa oranları farkının önemliliği

Çizelge 3.10. Çözüm sonu anormal spermatozoa oranları

Çizelge 3.11. Talp yıkama alt gruplarının çözüm sonu anormal spermatozoa oranları ve farkların önemliliği

Çizelge 3.12. Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu anormal spermatozoa oranları ve farkların önemliliği

Çizelge 3.13. Talp ve Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu anormal spermatozoa oranları farkının önemliliği

Çizelge 3.14. Çözüm sonu Hipoosmotik swelling (HOS) Test oranları

Çizelge 3.15. Talp yıkama alt gruplarının çözüm sonu HOS Test oranları ve farkların önemliliği

Çizelge 3.16. Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu HOS Test oranları ve farkların önemliliği

Çizelge 3.17. Talp ve Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu HOS Test oranları farkının önemliliği

Çizelge 3.18. Çözüm sonu akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranları

Çizelge 3.19. Talp yıkama alt gruplarının çözüm sonu akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranları ve farkların önemliliği

Çizelge 3.20. Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranları ve farkların önemliliği

Çizelge 3.21. Talp ve Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranları farkının önemliliği

RESİMLER

Resim 2.1. Ankara Tiftik Tekesinden sperma alma aşamaları ve kadeh içinde sperma

Resim 2.2. Ankara Tiftik Tekesi spermasının yıkanarak seminal plazmasından ayrılması

Resim 2.3. Santrifüj sonrası, yıkanmış Ankara Tekesi spermasının sulandırılması ve equilibrasyonu

Resim 2.4. Ankara Tekesi spermasının dondurulması, sıvı azot içine atılması, sıvı azot tankına aktarımı ve sıvı azot tankında saklanması

Resim 2.5. Ölü ve canlı spermatozoonlar (eozin boyama-sürme preparat)

Resim 2.6. Anormal spermatozoa örnekleri

Resim 2.7. Ankara tekesi spermasında yoğunluk tayini.

Resim 2.8. Ankara tekesi spermasında Hipoosmotik sıvıya değişik şekillerde yanıt vermiş spermatozoonlar.

1.GİRİŞ

1.1.TEKELERDE DÖLVERİMİ

1.1.1. Tekelerde Seksüel Olgunluk ve Davranışlar

Genç tekelerde seksüel davranışların (koklama, flehmen, sürtünme davranışları ve aşım) görülmesi, doğumdan sonraki bir kaç haftadan (avrupa ırklarında) bir yıla kadar (Damaskus ve Ankara Tekesi) değişiklik gösterir. Irklar arasında seksüel olgunluğa ulaşma bakımından büyük farklılıklar vardır. Seksüel olgunluğa ulaşma yaşları, hayvanların erken veya geç olgunluğa ulaşan ırklara ait olup olmamasına bağlı olarak, 4-8 aydan (cüce ırklar) 1-4 yıla (Ankara Tekesi) kadar değişmektedir (Lall, 1947; Elwishy ve Elsayaf, 1971).

Ankara Tekelerinde diğer ergin keçi ırklarının tekelerinde olduğu gibi, seksüel motivasyon ve etkinlik doğrudan hormonal salgılara ve sosyal davranışlara bağlıdır. Seksüel sezonun başlamasını takip eden testikular androjenlerin salınımı(kan plazma testosteron seviyesindeki gözle görülür yükselişin de ortaya koyduğu gibi) seksüel davranışlara öncülük etmektedir (Hoffman ve ark., 1972; Delgadillo ve ark., 1999). Seksüel davranışların tetiklenmesi, androjen salınımını ve sosyal davranışları içerir. Tekelerin seksüel motivasyonuna ve etkinliğine, sürü içindeki rekabet ve hiyerarşinin önemli etkileri vardır. Sosyal çevre, seksüel davranışların tam olarak sergilenmesinde önemli etmenlerden birisidir. Ayrıca sperma üretimini de uyarmaktadır. Östrusta bulunan dişi keçilerin varlığı, tekelerin seksüel davranışlarının sergilenmesinde, beslenme ve sezonal etmenlerle etkileşimli olarak önemli rol oynar (Walkden-Brown 1994a).

1.1.2. Sperma Üretimi

Tekelerde sperma üretimini değerlendirmek amacıyla, bir kaç araştırma yürütülmüştür. Her bir testisin günlük ürettiği spermatozoon sayısı, 2.76 dan 7.23 milyar arasında değişiklik göstermektedir. Bu fazlalığın nedeni sezonal veya türler arası farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Walkden-Brown 1994b). Seksüel olgunluğa ulaşmış Avusturya kaşmir tekelerinde, testis ağırlığı ve toplam testikular sperm ile skrotal çevre arasında pozitif ilişki olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $r=0.88$ ve 0.72). Skrotal çevre ölçümü basittir, testis ölçüsü ve testikular sperm içeriği hakkında kesine yakın doğrulukta bilgi sağlar. Ritar ve arkadaşları (1992) yetiştirme sezonu içinde, Ankara tekesinde günlük sperma üretimini hesaplamış ve 4 ila 6.4 milyar arasında olduğunu bulmuşlardır. Bu ırkta, epididimal spermatozoa rezervi, testikular ağırlık ($r=0.5$) ve testisteki spermatozoa sayısı ile ilişkilendirilmiştir ($r=0.42$). Fakat epididimal ağırlık ile bağıntı bulunamamıştır. Sık sperma alınımları ile hesaplanmış günlük sperma çıktısı günlük sperma üretiminin %40-80'idir. Alpin ve Saanen ırklarında günlük sperma çıktısı 2.96 ± 0.36 olduğu saptanmıştır (Degadillo ve ark. 1993). Bu çalışmalardaki günlük sperma üretimindeki dikkate değer farklılıklar, testikular ve epididimal sperm hesaplamak için kullanılan farklı tekniklere bağlı olabilir. Yine de, özellikle sperma sulandırılır ve saklanırsa, tekenin suni tohumlama programlarının ihtiyaç duyduğu miktarı rahatlıkla destekleyecek günlük spermatozoa çıktısına sahip olduğu görülür.

1.1.3. Seksüel Aktivite ve Sperma Üretiminde Mevsimsel Değişimin Etkisi

Yetiştirme sezonunun uzunluğu enlem ile ters olarak değişir. Ekvatora yaklaştıkça aşım sezonu uzunluğu artar. Doğumların zamanlamaları yıl boyunca aynı değildir. Bir çok lokal ırkta kış sonu ve bahar başında yoğunlaşır. Bu sezonal ırkların çiftleşme periyodu yaz sonunda başlar ve sonbahar-kış süresince devam eder. Ters olarak, tropik ve subtropik ırklarda tüm yıl boyunca görülür veya fotoperiyot dışındaki diğer faktörlerce etkilenir (Restall, 1991). Tekede seksüel davranışlar,

testikular boyut ve sperma üretimi sezonal olarak meydana gelen fotoperiyodik değişimlerce etkilenir. Tekelerde beslenmenin iyileşmesine rağmen bahar süresince seksüel aktivitede düşme tespit edilmiştir. Hayvanlara çiftleştirme denemeleri yapılarak, bu düşüş azaltılmıştır (Corteel, 1981). Yazın sonlarına doğru ve sonbahar döneminde Avustralya kaşmir tekelerinde, seksüel aktivitenin yeniden başlaması, canlı ağırlıktaki, büyümedeki, skrotal çevre ölçüsündeki, testesteron konsantrasyonundaki ve beslenmedeki değişimlerle ilişkilendirilmektedir (Walker ve ark. 1994a).

Alpine ve Poitevine ırklarının ejakulat hacimleri yetiştirme sezonu süresince, sonbahar ve kış döneminde yüksektir. Aşım sezonu dışında, baharda ve yazın en düşük seviyelere iner. Sperma yoğunluğu ise tersi seyir gösterir. Yetiştirme sezonu içinde testesteron seviyesindeki artış, aksesör bezlerden seminal plazma salınımını artırır. Sezon dışında ise testesterondaki azalmaya bağlı olarak düşer (Corteel, 1977; Karagiannidis ve ark., 2000).

Tekelerde spermatozoa kalitesi mevsimsel olarak değişir. Motil spermatozoa yüzdesi yetiştirme sezonu boyunca yüksek; yetiştirme sezonu dışında ise düşük olduğu belirtilmektedir (Delgadillo ve ark., 1992). Aşım sezonu dışında, sulandırılmış spermada, motil spermatozoa oranı haftalar boyunca düşük seviyelerde kalmıştır. Motilite oranlarında yıla ve bireye bağlı olarak değişimler de olmuştur (Corteel, 1981). Alpine keçileri sezon dışında sulandırılmış sperma ile tohumlandığında, fertilitedeki değişimler motilitedeki değişimleri takip etmiştir. Morfolojik anormaliteye sahip spermatozoa yüzdesinde küçük sezonal değişimler saptanmıştır. Anormal spermatozoa oranı sezon içinde %5-8 arasında iken, sezon dışında % 10-18 arasında seyretmiştir (Delgadillo ve ark., 1992; Tuli ve Holtz, 1992).

Ancak yukarıda belirtilen çalışmaların bulgularına ters düşecek sonuçlarda vardır. Avdi ve arkadaşlarının (2003) Yunanistan'ın lokal ırkları üzerinde yaptığı çalışmada tekelerin yıl boyunca spermatolojik parametreleri incelemiş ve sonuç olarak motilitede ve canlılık oranlarında önemli farklar olmadığı belirlenmiştir.

Ayrıca teke etkisi ile, dişi keçilerdeki östrus belirtilerinin Mart ayına kadar uzadığını, buna karşın ilkbahar mevsiminin ortalarına doğru tüm dişi keçilerin ovaryum aktivitelerinin azaldığını saptamışlardır.

1.1.4. Sperma Üretiminin Kontrolü

1.1.4.1. Fotoperiyodik Uygulama

İlk olarak koçlarda geliştirilen yapay fotoperiyodik çevrimin kullanımının tekelerde de dölerimsel etkinliği kontrol ettiği gözlemlenmiştir (Pelletier ve ark. 1988). Delgadillo ve arkadaşları (1992) kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, bir kaç aylık uzun gün (16 saat ışık (I); 8 saat karanlık (K)) ve bir kaç aylık kısa gün (8 I; 16K) uygulamaları arasındaki hızlı değişimin, Saanen ve Alpine tekelerindeki seksüel etkinlikteki değişimde düşüşe neden olduğunu belirlemişlerdir. Üç yıl boyunca fotoperiyodik uygulamaya maruz bırakılan tekelerde, haftada iki kere alınan spermadaki toplam üretilen spermatozoa sayısında, kontrol grubuna göre %62'lik artış gerçekleşmiştir. Sezonal ırklarda bu gibi fotoperiyodik manipulasyonların yapılmasının, yalnız altı ay boyunca sperma alınımı yerine tüm yıl boyunca sperma alınmasına olanak sağladığı ayrıca bildirilmektedir (Delgadillo ve ark. 1992).

1.1.4.2. Termal çevre

Ekvatorдан uzaklaşıldıkça, termal çevrenin reproduktif yönden tekelerdeki düzenleyici etkisi azalmaktadır. Fakat, subtropik ve tropik iklimde sıcaklık reproduktif etkinliği sınırlandırabilir. Sperma hacmi ve spermatozoa yoğunluğunun yüksek sıcaklıklarda düştüğü bulunmuştur (Yokoki ve Ogasa, 1977; Mukherfee, 1992) ayrıca nemin de önemli etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Mukherfee, 1992).

1.1.4.3.Sosyal Çevre ve İdari Koşullar

Erkek ve dişi hayvan arasındaki değişik etkileşimler her iki cinsten de seksüel davranışların tetiklenmesinde ve sürdürülmesinde önemli rol oynar. Aynı veya farklı cinsten hayvanların birlikte veya ayrı olması orta veya uzun vadede erkeklerdeki reproduktif performansı etkileyebilir (Signoret ve ark., 1990).

Yoğun yetiştirme çiftliklerinde, sperma üretimi için kullanılan genç tekeler, sıklıkla sütten kesildikten sonra bireysel bölmelerde bakılır. Pubertas (döle-erme) öncesi uniseks (aynı cins) gruplarda, erkek keçi yavrularının yetiştirilmesi gelecekteki seksüel davranışları olumsuz etkiler. Bu durum özellikle ileri yaşlarda suni vajenle sperma almak için kullanılacak damızlık genç tekeler için geçerlidir. Orgeur ve arkadaşları (1990) genç tekelerin heteroseksüel (ayrı cins/dişili-erkekli) grup içinde yetiştirilmesinin sperma üretimi üzerine olumlu etkisi olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada uniseks (aynı cins) grup içinde yetiştirmenin sperma üretimi ve kalitesi üzerine olumsuz etkiye sahip olmadığı da ortaya konmuştur.

Özetle, ileride damızlık teke olarak kullanılacak oğlakların bireysel bölmelerde yetiştirilmesi en iyi çözüm olarak görülmektedir. Fakat, ekonomik yönden erkeklerin olabildiğince küçük yaşta ayrılması önemlidir. Eğer tekenin seksüel tecrübesi varsa, ergin tekelerin bakımı bu yönden daha az sorunlu olacaktır.

1.1.4.4. Sperma Almanın Sıklığı ve Yöntemi

Genel olarak, sperma östrustaki dişi keçi varlığında suni vajenle alınır. Daha az sıklıkta ise elektriksel uyarım (elektroejekülatör) kullanılır. Son yöntemde, suni vajenle alınmış spermaya göre ejakulat hacmi yüksek, spermatozoa yoğunluğu düşüktür. Fakat spermatozoa motilitesinin etkilenmediği bildirilmiştir (Akusu ve ark., 1984). Seminal plazmanın, spermanın saklanması spermatozoonlar üzerine

zararlı etkiye sahip olması nedeniyle; sperma dondurulacak ise elektro-ejakulatörle sperma eldesi tercih edilen bir yöntem değildir.

Ekvatorдан uzaklaştıkça seksüel sezon boyunca, sperma alma haftada 2'den 7 ye çıkarılması, haftada elde edilen sperma miktarını üç katına çıkarır (Corteel ve ark. 1980). Fakat, sperma alma aralarındaki dinlenme sürelerinin uzatılmasının spermanın dondurulabilirliğine olumlu etkileri olduğu görülmüştür. Bu nedenden dolayı, bu dinlenme aralıklarının yetiştirme sezonun ikinci yarısında 2 günden 3 güne çıkarılması tavsiye edilmiştir (Boue ve Corteel, 1992). Çiftleştirme sezonu boyunca, sperma alma suni vajenle 5 dakika ara ile iki kere tekrarlanabilir.

Sevinç ve arkadaşları ise (1985) Ankara Tekerinde yaptıkları çalışmada hergün sperma alınmasının gün aşırı sperma alınmasına yeğlenmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

1.1.4.5. Dölerimsel Performansın Belirlenmesi

Sperma miktarı ve kalitesi en yüksek düzeye çıkarılmak isteniyorsa, genç tekelerden suni vajenle sperma alınabilirliğinin, iyi kalitede ve çözüm sonrası canlılık oranı yüksek sperma verebilme özelliklerinin belirlenmesi gerekir.

Yukarıda belirtilen genç tekelerin seçiminin aşağıdaki kriterlere göre yapılması önerilmektedir:

- a) Suni vajenle sperma alma denemelerinde en az %80 başarı,
- b) 0.2 ml den fazla ejakulat veriyor olması,
- c) En az 1 milyar/ml spermatozoon yoğunluğu,
- d) Dondurmadan önce en az %60, dondurduktan sonra ise en az %30 canlı spermatozoa oranı,
- e) Çözdürmeden sonraki 5 dakika sonunda 3.0 skorluk motilite (Corteel ve ark. 1987).

1.1.5.Teke Spermasının Saklanması

Spermanın saklanması, özellikle de dondurulması, spermatozoada ultrastruktural, biyokimyasal ve fonksiyonel hasara neden olur. Bunun sonucu olarak motilitede ve canlılıkta kayıp görülür. Motilite ve canlılıktaki kayıplar fertilite oranını etkiler. Birçok çalışma bu sorunun çözülmesine odaklanmıştır. Fakat dondurulmuş spermanın fertilitesi, genelde taze spermanınkinden daha düşüktür. Keçi spermasının saklanmasıdaki en önemli problem, yumurta sarısı ve süt içeren sulandırıcılarla sulandırılmış spermatozoonların canlılığı üzerine seminal plazmanın zararlı etki göstermesidir. Yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla ilişkilendirilen problem, bulbouretral bez sekresyonunda bulunan ve seminal plazmada yer alan, yumurta sarısı koagüle edici özellik taşıyan enzime bağlanmıştır. Sütü sulandırıcılarda saklama süresince spermatozoonların canlılığının baskılanması, bir protein fraksiyonuna bağlanmaktadır. SBUIII olarak isimlendirilen, bu protein fraksiyonu yine bulbouretral bezden kaynaklanır ve sulandırıcıdaki süt bileşenleri ile etkileşime girerek keçi spermatozoonlarının motilitesini baskılar. Bu etkiden sorumlu olan bulbouretral bileşik, trişilgliserol (tricylglycerol) olarak saflaştırılmış, karakterize ve identifiye edilmiştir (Roy 1957; Iritani ve ark. 1961).

1.1.5.1.Yumurta Sarısı Koagule Edici Enzim (EYCE):

EYCE'in toksitesi hidrolisatların miktarına göre değişir. Hidrolisatların miktarı pH, sıcaklık, seminal plazma konsantrasyonu, sperma eldesinin sezonuna ve yumurta sarısının sağlandığı kümes hayvanın ırkına göre değişiklik gösterir.Yapılan çalışmalarda, teke spermasının sulandırmadan önce bir kere yıkandığında, +4 derecede saklamada, spermatozoonların canlılıklarını daha uzun süre muhafaza ettikleri gözlenmiştir (Roy 1957; Iritani ve ark. 1961). Aynı araştırmacılar, 60 derecede 2-5 dakika ısı muamelesinin, EYCE etkinliğini yok ettiğini de belirlemişlerdir. Aynı zamanda pıhtılaşma etkinliği ile EYCE yoğunluğu arasında doğru ilişki de tespit edilmiştir.

EYCE, yumurta sarısı lesitinini yağ asitlerine dönüştüren ve lisolektin hidrolizini katalizleyen fosfolipaz A olarak identifiye edilmiştir. Lisolesitin bileşiği teke spermatozoonları için toksiktir. Seminal plazmadaki fosfolipid A etkinliği yumurta sarısı kullanılarak kanıtlanmıştır. Fakat, yumurta sarısı fosfolipidleri ve trigliseridleri içerir, bu nedenle fosfolipid etkinliği üzerine yapılmış araştırmalar, lipaz aracılığı ile yağ asitlerinin yumurta sarısı trigliseritlerinden serbestleşmesinin göz ardı edilemeyeceğini de ortaya koymuştur. Bu yüzden, seminal plazmadaki etkin ajanın spesifik fosfolipaz A olduğunun doğrulanması amacıyla, EYCE'nin yapısal ve enzimatik özelliklerinin incelenmesi sürdürülmektedir (Iritani ve Nishikawa, 1963).

1.1.5.2.Süt ile Etkileşen Proteinler

Teke seminal plazmasında SBUIII olarak isimlendirilen ve süt bazlı sulandırıcı bileşenleri ile etkileşime giren bir protein fraksiyonunun, in vitro şartlarda spermatozoa canlılığını baskılamaktan sorumlu olduğu saptanmıştır. Krebs Ringer Phosphate Glucose (K RPG) solusyonu ile sulandırılmış spermatozoalar üzerinde her hangi bir etki gözlenmezken, yıkanmış sperm hücrelerine SBUIII' ün

eklenmesinin sperm canlılığını olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, spermatozoonlara toksik bir ürün meydana getirecek şekilde, ya bulbouretral bez salgısından bir enziminin süt bileşikleriyle ya da süttten kaynaklı bir enzimin SBU ile etkileştiğini ortaya koymuştur. Bunlara ek olarak, elektron mikroskop ile yapılan araştırmalarda, kaudo epididimal spermatozoonların, BUS' a maruz bırakıldıktan sonra, süt sulandırıcılarının varlığında, %95' nin akrozom reaksiyonu gösterdiği doğrulanmıştır. Vesikular bez sekresyonunun (VGS) varlığı yalnızca %5 oranında akrozom reaksiyonuna neden olurken, vesikular ve bulboüretal bez salgılarının karışımı kullanıldığında (VGS=2.5 mikrolitre/ml ve BUS 2.5 mikrolitre/ml) bu oran %26.7 olarak saptanmıştır. Bu durum VGS' nin koruyucu özelliğini göstermektedir (Courten ve ark. 1984).

Pellicer (1997) yağsız sütle sulandırılmış spermatozoonların zarar görmesinden sorumlu olan SBUIII bileşenini saflaştırmış, karakterize ve tanımlamıştır. SBUIII bileşeni 55-60 kDa ağırlığında, heparine afinite gösteren N-glycosyl proteindir (BUSgp60). Bu proteinin, yağsız süt ile sulandırılmış teke epididimal spermatozoonlarının motilitesindeki düşüşü, akrozomal ve hücresel bozulmayı arttırdığı gözlemlenmiştir. BUSgp60 triasilgliserol (triacylglycerol) hidrolaz aktivitesi göstermektedir. BUSgp60'ın enzimatik etkinliği pankreatik lipaz aktivitesine benzetilmektedir. Pellicer aynı zamanda BUSgp60 ile etkileşime girerek spermatozoa hasarına neden olan süt bileşenlerini de belirlemiştir. Diğer taraftan, süt proteinlerinin özellikle de kazein ve laktoglobulinin, BUS lipaz etkinliğini arttırdığını bulmuştur. Bunlara ek olarak BUS lipaz aktivitesinin sperm üzerindeki zararlı etkileri, yalnızca ortamda triglycerid (yağsız süttten kaynaklı trigliseritleri veya triolein) varlığında gözlemlenmiştir. Bu durum, BUS'un spermatozoonlar üzerindeki olumsuz etkisinin sütte bulunan trigliceritleri parçalamasından ileri geldiğini düşündürmüştür. Bu görüşler doğrultusunda, SBU lipazın sütte bulunan triglicerit ve doymamış yağ asitlerini (oleik asit) hidrolize etmede çok etkili olduğu belirlenmiştir (Pellicer ve ark., 1997).

1.1.5.3. Tekelerde Sperma Saklama Öncesi Seminal Plazmanın Uzaklaştırılmasının Önemi

Tekede, sperma almayı takiben yıkama ile seminal plazmanın uzaklaştırılmasının, yumurta sarısı veya süt içerikli sulandırıcılarda saklama sürecinde canlı spermatozoa ve motilite yüzdesini arttırdığı bildirilmektedir. Yine de yıkanmış sperma epididimal spermanın kalitesine ulaşamamaktadır. Bu bulgunun anlamı, in vitro saklama açısından seminal plazmada zararlı bileşenlerin olduğudur (Courstens ve ark. 1984; Pellicer, 1996).

Yetiştirme sezonu içinde alınan ejakulatlar, sezon dışı elde edilenlere göre daha fazla seminal plazma içerir. Tüm yıl göz önüne alındığında, çözüm sonrası motil spermatozoon yüzdesi ile seminal plazma hacmi arasında yüksek negatif ilişki bulunmuştur (Cortee, 1977). Aynı araştırmacı, dondurma çözündürme sonrası, motil spermatozoa oranı ile sperm yoğunluğu arasında pozitif ($r=0.9$) ve ejakulat hacmi arasında negatif ($r= - 0.9$) korelasyon saptamıştır. Ayrıca, mevsime bağlı olarak teke spermasının fiziko-kimyasal bileşiminin değiştiği de bildirilmektedir. Özellikle spermada (seminal plazmasında) bulunan fruktoz düzeyindeki değişim teke spermasının sezon dışı dondurulabilirliğini olumsuz etkileyebilir (Dündar ve ark., 1985).

Ejakule edilmiş ve epididimal spermatozoonların süt bazlı sulandırıcılardaki, canlılık oranlarını incelendiği bir çalışmada, kısa süreli saklamadan, dondurma-çözdürmeden ve 37 derecede bekletildikten sonra, canlı spermatozoa ve motilite oranlarının epididimal spermada daha yüksek olduğu bulunmuştur (Chemineau, 1991). Sezon dışı üretilen seminal plazmanın, yetiştirme sezonu içinde elde edilmiş seminal plazmaya göre, süt bazlı sulandırıcılarla sulandırılmış epididimal spermatozoonların canlılık ve motilite oranları üzerine daha olumsuz etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu durumun, yetiştirme sezonu dışında meydana gelmeyen

vesicular bez salgılarının, bulboüretal bez salgılarının spermatozoonlar üzerindeki olumsuz etkilerini baskılamasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür.

Fizyolojik solüsyonlar ile spermatozoonların yıkanması, dondurma öncesi ve sonrası motil spermatozoa oranını yükseltmiştir. Yıkanmış spermatozoonların dondurma-çözdürmeye karşı dayanıklılığındaki düzelme yalnız süt bazlı sulandırıcılarda değil yumurta sarısı içeren sulandırıcılarda da görülmüştür. Ritar ve Salamon'nun yaptığı çalışmada, çözdürme sonrası kabul edilebilir canlı spermatozoa oranı veren sulandırıcıdaki yumurta sarısı oranının, spermanın alındığı aya göre, %0 ile 12 arasında olduğunu bulmuşlardır. Bunlara ek olarak, yıkanmış spermanın çözüm sonrası spermatolojik parametreleri, yıkanmamış spermanınkine benzerlik gösterse de, özellikle yumurta sarısı varlığında (%1.5 ve 6), 37 derecede 6 saatlik inkubasyon süresince, yıkamanın spermanın canlı kalma yüzdesinde dikkate değer düzelme sağladığı bulunmuştur (Ritar ve Salamon, 1982). Spermanın yıkanmasının olumlu etkilerine ek olarak; spermanın alındığı mevsimin de önemli olduğu belirlenmiştir. Aşım sezonu içinde elde edilen spermanın dondurma çözdürme etkileşimine daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Corteel ve ark. 1980).

Corteel (1981), sperma yıkama işleminin kompleks, pahalı ve spermatozoonlarda kayba neden olan bir işlem olduğunu belirtmiştir. Buna ek olarak, sütçü ve yün üretimi için kullanılan keçi ırklarında fertiliteye olumlu bir etkisi görülmemiştir. Ritar ve Salamon (1983), seminal plazmayı uzaklaştırmaksızın % 1.5 yumurta sarısı içeren tris bazlı sulandırıcı kullanmanın pratik bir alternatif olduğunu belirtmişlerdir.

Bunlara ek olarak, Daşkın'ın (1991), yürütmüş olduğu tez çalışmasında dondurma amacıyla kullandığı sulandırıcıya yüksek oranlarda eklenen (%20), yumurta sarısının (çalışmasının içinde düşük oranlarda eklenen yumurta sarısı ile bir kıyaslama olmamasına rağmen) spermatozoonlar üzerine her hangi bir olumsuz etkisine rastlamadığı bildirilmektedir.

1.1.5.4. Kısa Süreli Saklama

Teke sperması 2 ile 15 derece arasında kısa süreli saklanabilir. 4-5 derece (buzdolabı sıcaklığı) ise tercih edilen sıcaklıktır. Teke spermasının kısa süreli saklaması amacıyla, ihtiyaç duyulan sulandırıcılarla ilgili olarak sistematik her hangi bir araştırma yürütülmemiş olsa bile, bir çok sulandırıcı fertilite ve laboratuvar testlerinden geçirilmiştir. Bu güne kadar teke spermasının kısa süreli saklanması kullanılan sulandırıcılar: fizyolojik tuzlu su, sodyum sitrat yumurta sarısı, sodyum sitrat fruktoz yumurta sarısı, sakkaroz EDTA CaNa₂ yumurta sarısı, yumurta sarılı ve ya yumurta sarısız yağlı, yağsız veya bileşenleri ayarlanmış süt, Cornell University Extender (CUE), Spermasol, Diloften, Neoseminan, Illini Variable Temperature (IVT) dır.

Yukarıda belirtilen sulandırıcıların kullanıldığı kısa süreli (5-72 saat) saklama çalışmalarında in vitro canlılık ve fertilite oranları büyük farklılık göstermektedir. Neoseminan sulandırıcısında (asetonla çökeltilmiş yumurta sarısı içerir) spermatozoonlar 4 derecede 8-15 gün süresince canlılığını korumuş ve 6 gün süresince fertilizasyon kapasitelerini muhafaza etmişlerdir (Nishikawa ve ark. 1961). Fakat, Neoseminan kompleks olması nedeniyle kısa süreli saklamada beklenen ilgiyi görmemiştir. Ayrıca, sitratlı sulandırıcıda aseton çökeltilmiş yumurta sarısının varlığının fertiliteyi olumlu yönde etkilediği doğurulanmamıştır. Diğer belirtilen sulandırıcıların performanslarındaki büyük farklılık, seminal plazmanın sulandırıcı içindeki yumurta sarısı ve süt bazlı sulandırıcı bileşenleri ile etkileşime girebilmesi dikkate alındığında şaşırtıcı değildir. Bir çok araştırmacı yıkanmamış sperma kullanarak 5-8 saat arasında kısa süreli saklanan yıkanmamış spermatozoonların fertilitesi ve canlılığı olumsuz etkilenmesine rağmen, daha uzun süreli (12-24 saat üstü) saklanan spermalarda ise fertilitede düşüş gözlemlenmiştir. Daha önceden de belirtildiği gibi, yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla elde edilecek başarı iki faktöre bağlanmıştır; (a) sezonal ve bireysel (her bir tekeye bağlı) olarak değişen seminal

plazmadaki EYCE varlığı , (b) tavukların yetiştirilmesine bağı olarak değişiklik gösteren yumurta sarısı içeriğindeki varyasyon. Bu konuda, yumurta sarısının eldesi amacıyla ağır tavuk ırklarının yumurtalarının, hafif tavuk ırklarına nazaran tercih edilmesi yönünde bilimsel öneriler bulunmaktadır.

Kısa süreli saklamada, seminal plazma ile yumurta sarısı arasındaki olumsuz etkileşimin azaltılması için sulandırıcıdaki yumurta sarısı oranının azaltılması da uygun bir çözüm olabilir. Roca ve ark.(1997) teke spermasının kısa süreli saklanması, yıkanmamış spermanın kullanıldığı grupta sulandırıcıdaki yumurta sarısının oranını %12'den %2'ye çektiklerinde, yıkanmış sperma ile yıkanmamış sperma arasında gebelik oranları bakımından önemli fark saptayamamışlardır (%70,3'e %73,5).

Eppleston ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada (1994), 5 derecede tris fruktoz yumurta sarısı içeren (%2) sulandırıcıda, en az 8 gün boyunca spermatozoonların fertilizasyon yeteneklerini koruduklarını göstermişlerdir. Pomares ve arkadaşları (1994) ise, glutathione peroksidazın (1 IU/ml) tris bazlı sulandırıcıya eklenmesinin, 12 gün boyunca 5 derecede saklanan spermatozoonların canlılığında olumlu etki sağladığını bildirmişlerdir. Katalaz, superoksit dismutaz, sitokrom c, glutathione peroksidaz gibi antioksidanların sulandırıcılara eklenmesinin spermatozoa canlılığında olumlu etki sağlarken, in vitro fertilizasyon oranlarına herhangi bir etkisinin olmadığı da bildirilmiştir. (Stojanov ve ark. 1994; Pomares ve ark. 1995).

1.1.5.5. Teke Spermasının Uzun Süreli Saklanması

Teke spermasının ilk kez Smith ve Polge (1950) tarafından dondurulmasından ve Barkerin (1957)'in dondurulmuş çözündürülmüş teke spermasının pratik uygulamalar için yetersiz olduğunu, belirtmesinden buyana, bir çok araştırmacı teke spermasının dondurulmasına ilişkin araştırmalar yapı gelmiştir. İlk zamanlarda, teke spermasını

dondurmak amacıyla çoğunlukla boğalar için geliştirilen sulandırıcılar denenmiştir. Belirtilen fertilizasyon sonuçları ise yetersiz (% 3-15), orta (% 20-48) ve güvenilir (%70 e kadar) olmuştur. Sonuçların bu kadar farklı olması şaşırtıcı değildir. Çünkü, ilk zamanlarda, dondurma amacıyla seminal plazma içeren sperma sulandırılıyor ve işleniyordu. Fakat 1950'lerin sonlarına doğru teke seminal plazmasının spermatozoonların canlılığını sürdürmesi için zararlı olduğu bulunmuştur. Corteel (1977) ejakulasyondan hemen sonra seminal plazmanın uzaklaştırılmasının spermatozoanın canlılığını devam ettirmesi açısından yararlı olduğunu gözlemlemiş ve spermanın yıkanmasını önermiştir. Bir çok araştırmacı ise sperma yıkama yöntemini uyarlamışlardır. Fertilizasyon oranını etkileyecek diğer bir faktör ise ekilibirasyondur (alışımdır). Kabul edilebilir alışım zamanı 1 ile 3 saat arasındadır (Das ve Rajconvar, 1995; Singh ve ark. 1995). Teke spermasının yıkanması: ilk aşama olarak yeni alınmış olan teke spermasının yıkama solusyonları ile sulandırılmasından (1:5 veya 1:10) ve ikinci aşama olarak 600-1000 g (yerçekimi ivmesi $\cong 9,8 \text{ m/sn}^2$) de 10-15 dakika santrifüjünden ibarettir. Sulandırma amacıyla, Krebs Ringer fosfat buffer (glukoz içeren veya içermeyen) ve ya gliserolsüz dondurma solusyonları gibi, farklı yıkama solusyonları kullanılmıştır.

Etkili bir şekilde seminal plazmanın uzaklaştırılması, yıkama solusyonu sperma oranına ve yıkama sayısı gibi yıkama yönteminin yoğunluğuna bağlıdır. 1:5 veya 1:10 sulandırıldıktan sonra iki kere yıkama işleminin gerçekleştirilmesinin bir kere yapılmasına göre çok daha etkili olduğu belirtilmektedir. Yüksek sulandırma oranları ile her iki yöntemin etkinliği artırılabilir. Bu nedenle, tek yıkama işleminden önce yüksek oranlarda spermanın sulandırılması (1:20) ile yıkama sayısı azaltılabilir (Ritar ve Salamon, 1982).

Corteel'in yönteminde (1981) yıkanmış spermatozoa gliserol içermeyen sulandırıcılarla, son hücre yoğunluğunun yarısına ulaşacak şekilde sulandırılır ve 30°C den 4°C ye 1 saatte soğutulur. Daha sonra gliserol içeren sulandırıcı (%14) son hücre yoğunluğu 400-500 milyon olacak şekilde eklenir, böylece son gliserol konsantrasyonunun %7 olması sağlanmış olur. Bu işlemlerden sonra, 4°C de 1-3 saat arasında tutularak alışım işlemi tamamlanmış olur.

Seminal plazma spermadan ayrılmaksızın (yıkama yapılmadan) sperma dondurulacaksa, yeni alınmış sperma 30°C de gliserol içeren sulandırıcı ile sulandıktan ve 1-1.5 saatte 4-5°C ye kadar soğutulduktan sonra ekilibrasyon yapılmaksızın dondurulabilir (Ritar ve Salamon, 1983; Ritar ve ark.; 1990a). Bu yöntem alternatif olarak, yıkanmamış spermanın dondurulması iki aşamada yapılabilir. Alınmış olan sperma önce gliserolsüz sulandırıcı ile sulandırılır, 1-1.5 saatte 4-5°C ye kadar soğutulduktan sonra ikinci basamak olarak gliserol içeren sulandırıcı ile sulandırılır ve 1.5 saat ekilibrasyonda tutulduktan sonra dondurulur. İki basamaklı yöntemin, tek basamaklı yöntemle karşılaştırıldığında çözündürme sonrası canlılık bakımından her hangi bir avantaja sahip olduğu belirlenememiştir (Ritar ve Salamon, 1982).

1.1.5.5.1. Teke Spermasının Saklanması Kullanılan Sulandırıcılar ve Kryoprotektanlar

Bileşenleri düzenlenmiş inek sütü, sodyum sitrat glukoz yumurta sarısı, laktoz yumurta sarısı, sakkaroz EDTA.CaNa₂ yumurta sarısı, raffinöz yumurta sarısı, Spermasol yumurta sarısı, IVT (İllini Variable Temperature) yumurta sarısı ve Test yumurta sarısı gibi bir çok sulandırıcı keçi spermasının dondurulması için incelenmiştir. Çözündürme sonrası canlılık ve fertilite oranlarının değerlendirilmesi sonucunda sulandırıcılar arasında önemli farklar belirlenememiştir. En yaygın kullanılan sulandırıcı, bileşenleri düzenlenmiş yağsız süt glukoz (0.5 M) (Corteel, 1977) ve tris glukoz sitrik asit yumurta sarısıdır (Salamon ve Ritar, 1982).

Etilen glikol ve propilen glikol, teke spermatozoonları için gliserole göre daha az koruma sağlar. Bu nedenle glycerol teke spermasının dondurulmasında kullanılan başlıca kryoprotektan olmuştur. Farklı araştırmacıları tarafından kullanılan gliserol

yoğunluğu %3 ile %9 arasında değişmiştir. Sulandırıcıdaki optimum gliserol oranının % 4-7 olduğu belirtilmektedir (Waide ve ark.,1977).

Corteel 'in yönteminde (1981) yağsız süt içeren sulandırıcıya gliserol son yoğunluğu %7 ve ml de 400-500 milyon spermatozoa olacak şekilde, 4°C de üç basamakta eklenmektedir. Ritar ve Salamon (1982)'un yönteminde ise gliserollü tris bazlı sulandırıcı yıkanmamış spermaya 30°C de tek basamakta eklenir. Gliserol ve yumurta sarısı konsantrasyonları sırasıyla %4 ve %2 olacak şekilde ayarlanır. 4 °C de gliserolün eklenmesinin 30°C de eklenmesine göre her hangi bir avantaja sahip olmadığı bildirilmiştir (Salamon ve Ritar, 1982: Tuli ve Holtz, 1994).

1.1.5.5.2. Teke Spermasını Dondurma Yöntemleri

Sulandırılmış teke sperması 4-5°C ye kadar soğutulduktan ve ekilibrasyona bırakıldıktan sonra, payet veya pelet şeklinde dondurma işlemi gerçekleştirilir. Normal koşullarda, sperma içeren payetler yatay olarak sıvı azotun 4-5 cm üzerinde, sıvı azot buharında 4-5 dakika tutulur ve bu sürenin sonunda sıvı azota daldırılır. Fransa'da, payetlerin önce sıvı azotun 16 cm üstünde 2 dakika sonra ise 4 cm üzerinde 3 dakika tutulması önerilmektedir. Donma hızı payetlerin sıvı azot seviyesinden uzaklığı ve payetlerin hacimlerine göre değişebilir.

Pelet yönteminde ise, dondurma kuru buzda (-79°C de) gerçekleştirildikten sonra peletler sıvı azota aktarılır. -79°C de dondurmanın hızı peletlerin hacmine bağlı olarak değişebilir. Spermanın payet veya peletteki hacmi dondurma hızı üzerine önemli etkiye sahiptir. Fakat, dondurma çözündürme sonrası canlılık oranı üzerine etkisi görülmemiştir. Payetlerin önceden soğutulmuş ağ veya delikler açılmış metal yüzey üzerinde dondurulmasının, sadece iki noktadan temas sağlayan yöntemle göre daha iyi sonuç verdiği belirtilmektedir. Bu durumun, çok noktadan teması sağlayan rafın ani donmayı engelleyerek veya en aza indirerek sıcaklık dalgalanmasının önüne

geçmesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Ritar ve ark., 1990). Çözdürme sonrası canlılık ve fertilite oranlarına bakıldığında pelet yönteminin payete göre üstün olmasına (Ritar ve ark., 1990; Ritar ve Ball 1991) ve payet yönteminin daha fazla zaman almasına rağmen (Corteel, 1981), tercih edilen yöntem payet şeklinde dondurmadır. Çünkü, bu yöntem sperma miktarının en doğru şekilde belirlenmesini sağlamaktadır.

1.1.5.5.3. Spermanın Çözülmesi

Çözdürme sonrası en iyi fertiliteyi elde etmek amacıyla, çeşitli çözdürme sıcaklıkları ve süreleri önerilmektedir. Payet veya pelet şeklinde dondurulmuş spermanın 37°C de çözdürülmesi kabul edilebilir fertilite sonuçları vermiştir (Salamon ve Ritar, 1982; Corteel, 1977). Deka ve Rao (1987) da , yaptıkları çalışmada, en iyi sonucu 37 °C de almışlardır. Andersen ise (1969) 75°C de 10 saniyede çözmenin 37°C de 30 saniyede çözmekten daha iyi sonuç verdiğini belirtmiştir. Tuli ve arkadaşları (1991), Boer keçilerinin kullanıldığı çalışmada, payetlerin 70 °C de 7 saniyede çözülmesinin hem 37 °C de 2 dakikada hem de 40 °C de 20 saniyede çözmekten üstün olduğunu bulmuşlardır. Fakat, saha koşullarında yapılan suni tohumlamada 37 °C de çözmenin daha uygun olduğuna dikkat edilmelidir. Böylece çözülmüş spermanın aşırı ısınmasının önüne geçilmiş olur. Pelet şeklinde dondurulmuş sperma, çözdürme solüsyonu içeren deney tüplerinde 37°C de çözülür.

1.1.5.5.4. Uzun Süreli Saklamanın Başarısını Etkileyen Faktörler:

- (a) Spermasının dondurulabilir olup olmadığı test edilmiş tekelerin kullanılıp kullanılmadığına,
- (b) Kullanılan spermadan seminal plazmasının ayrılmış olup olmadığına, yıkama yöntemine, yıkamada kullanılan yıkama solüsyonunun içeriğine, yıkamanın yoğunluğuna (sulandırma oranı ve santrifüj sayısı),
- (c) Dondurmada kullanılan sulandırıcının içeriği ve yumurta sarısının olup olmamasına,
- (d) Sulandırmanın yöntemi, gliserolün eklenmesi ve konsantrasyonu,
- (e) Dondurmadan önce, ekilibrasyonun uygulanıp uygulanmaması ve süresi,
- (f) Mini (0.25ml) veya orta boy (0.50ml) payet veya pelet yöntemi ile dondurma.

1.1.5.5.5. Teke Spermasının Uzun Süreli Saklanması Zamanın Önemi

Diğer hayvan türlerinde olduğu gibi, keçide de spermanın dondurularak saklanması fertilitede düşüş olup olmadığının belirlenmesi önemlidir. Corteel (1977), yağsız süt glukoz sulandırıcısı kullandığı çalışmada, yıkama işlemine tabi tutulmamış sperma kullanıldığında, motilitede 3-90 günler arasında % 16.6 ve 91-180 günler arasında % 22 düşüş gözlemlemiştir. Aynı çalışma yıkanmış sperma ile yapıldığında motilitedeki azalma sırası ile % 0 ve % 1.3 olmuştur. Ritar ve Salamon (1991) da tris glikoz sitrik asit yumurta sarısı (%4 gliserol) kullanarak yaptıkları uzun süreli saklamada, 6 aylık süreç sonunda spermatozoonların canlılığında düşüş bulmuşlardır. Corteel'in yaptığı çalışmayı doğrular yönde, yumurta sarısının

varlığına ve dondurma öncesi spermanın yıkanıp yıkanmamasına bağlı olarak motilitede düşüş gözlemlenmiştir.

Teke spermasının uzun süreli saklanması üzerine olumlu bulgular da vardır. Waide ve arkadaşları (1977), spermayı yıkamadan kullanarak 1-1022 gün arasında uzun süreli saklamışlardır. 1-30, 31-102 ve 210-1022 günler arasında saklanan dondurulmuş sperma ile yaptıkları derin servikal tohumlama ile sırasıyla %63.3, %79.4 ve %77.7 gebelik oranları elde etmişlerdir. Diğer bir araştırmacı ise, tris fruktoz sitrat ve yumurta sarılı (%8 gliserol içeren) sulandırıcı ile yıkanmış spermayı 1-3 yıl arasında sakladıktan sonra yaptığı intrauterin tohumlamalar sonunda %63.4'lük yavru oranı elde etmiştir.

Donmanın spermatozoonlarda oluşturduğu hasar Waltson (1995) tarafından incelenmiştir. Spermatozoonların özellikle ozmotik değişime karşı duyarlı olduğu ve su kütesinin donma esnasında hareketinin membran hasarı yarattığı sonucuna varılmıştır. Watson sıcaklık değişimi nedeniyle lipid yapılarının reorganizasyonunun çeşitli streslere karşı membran duyarlılığını arttırdığını da gözlemlemiştir. Ayrıca, dondurma çözündürme sonrası elde edilen spermatozoonların canlı fakat natif spermaya göre daha düşük fertilitereye sahip olduğunu gözlemlemiş ve bu durumun, dondurmanın değişik yollarla spermatozoonun membran yapısını etkilemesinden kaynaklandığını ileri sürmüştür. Dondurma çözündürme sonrası, spermatozoonun membranındaki yeni yapılanma erken akrozom reaksiyonlarına, canlılık süresinde kısaltmaya ve fertilitere düşmeye neden olmaktadır. Bu yüzden, dondurulmuş çözündürülmüş spermatozoonlar kısmen kapasite olur ve daha kısa zaman aralığında, fertilizasyon yeteneğine sahiptir.

1.2. Seminal Plazma

Seminal plazmanın içeriği ve miktarı hayvan türlerine, ırklara hatta bireylere göre değişse de aynı amaca hizmet etmektedir. Bir çok kaynakta belirtildiği gibi, seminal plazma spermatozoonların dişi genital kanala, en sağlıklı şekilde ulaşımını sağlayan bir araçtır. Spermatozoonların canlılığının korunması seminal plazmanın varlığına bağlıdır. Seminal plazma spermatozoonların canlılığını koruyabileceği en uygun pH'ya, mineral içeriğe, spermatozoonların enerji gereksinimini sağlayacağı çeşitli bileşiklere sahiptir. Ayrıca spermatozoon membranının stabilizasyonunu sağlayan çeşitli dekapasitör bileşikler de içerir.

1.2.1.Seminal Plazmanın Kaynağı (Eklenti Bezleri)

Seminal plazmanın kaynağı eklenti bezleridir. Her eklenti bezinin seminal plazmanın oluşumuna katkısı farklıdır.

A)Vas deferens ve ampullası: Vas deferensler (duktus deferensler) spermayı kauda epididimisten üretraya aktaran (taşıyan) ince uzun boru şeklindeki yapılardır. Kalın muskular (kassal) tabakaya sahiptir. Kassal tabakanın kalınlığı palpasyonda vas deferenslerin sert ve kordon gibi hissedilmesinin nedenidir.

Vas deferens kauda epididimisten çıktıktan sonra kaput epididimis yakınlarından itibaren kan, lenf damarları ve sinirlerle bir arada seyrederek spermatik kordonu (funikulus spermatikus) oluşturur. Bu yapı da inguinal kanaldan abdominal kaviteye geçer.

Vezikülo ürethralisin (sidik kesesinin) üst iki yanından seyreden duktus deferensler kademeli olarak daha kalınlaşarak ampulla duktus deferensi oluşturur.

Bu iki ampulla vezikular bezlere göre çok daha küçük çaptadırlar. Ancak veziküler bezlere göre kalın duvar yapısına sahiptir. Kalın duvar yapısı veziküler bezde gözlemlenmez.

Ampullar bez vezikuler beze göre tübüler tarzdadır. Histolojik olarak da veziküler bezlere göre çok küçüktür. Her iki ampulla prostatın altından geçerek veziküler bezin sekretörük kanalıyla birleşerek (bu durumda kanal duktus ejakulatoryus ismini alır) üretraya açılır.

Seksüel uyarım veya çiftleşme öncesi kızdırma kauda epididimisteki sperm vas deferensteki peristaltik hareketler yoluyla ampullaya aktarılır.

B) Veziküler Bezler: Veziküler bezler (glandulae vesiculares) eskiden spermanın depo edildiği yer olduğu düşünülmekteydi. Bu yanlış değerlendirme nedeniyle seminal kese olarak adlandırılıyordu.

Mann ve arkadaşları veziküler bezlerin yüksek konsantrasyonda potasyum sitrik asit ve bir çok enzimi içerdiğini belirlemişlerdir. Yüksek flavin içeriği nedeniyle sekret içeriği ruminantlarda yeşil renklidir. İçeriğin pH'ı 5,2 ile 6,2 arasında değişmektedir. Bir boğada ejakulat hacminin %50 sini oluşturmaktadır.

C)Prostat ve Cowper Bezleri (Bulboürethral Bezler): Üretranın etrafını saran prostat bezi iki bölümden oluşmaktadır. Bu iki bölüm corpus prostatae ve pars disseminate prostat olarak isimlendirilir.

Cowper bezleri (bulboürethral glandlar) ürethranın pelvik boşluktan çıktığı kısımda yer almaktadır. Bu bezlerin büyüklüğü boğada fındık kadardır. Çiftleşme öncesi ürethranın temizlenmesinden sorumlu bir bezdir. Alkali içerikli berrak bir salgı yapar (pH 7,5-8,2). Ön hazırlık yapmaksızın (kızırtırma/teasing) suni vajenle alınan spermada bol miktarda bulunur.

Tüm bu aksesör (eklenti) bezlerinin salgıları apokrindir. Diğer bir deyişle hücrenin içindeki salgı lümene verilerek salgı oluşturur. Bu üç bezdeki kassal yapı, bezdeki içeriklerin bir anda salınımını sağlar (Blom,1962).

1.2.2. Seminal Plazmanın İçeriği

Seminal plazmada, yukarıda sözü geçen: epididimis, vas deferens, prostate, Vesicula seminalis ve cowper bezlerinin salgıları karışmış olarak bulunur. Bileşiminde çeşitli organik maddeler fazla miktarda mevcuttur. Bu maddeler fosforilkolin, gliserilfosforilkolin, sitrik asit, fruktoz, inositol, sorbitol ve ergotiyonin dir. Seminal plazmada bulunan başlıca inorganik maddeler ise potasyum, kalsiyum ve bikarbonattır.

Fosforilkolin ve Gliserilfosforilkolin: Çiftlik hayvanlarında özellikle gliserilfosforilkolin çok yüksek miktarlarda bulunur. Özellikle koçların seminal plazmasında yüksek oranda gliserilfosforilkolin vardır. Gliserilfosforilkolin spermada uzun zaman yapısını koruyamaz gerek spermatozoadaki gerekse seminal plazmadaki fosfataz enzimi aracılığıyla serbest fosforik asit ile koline dönüştürülür.

Sitrik asit: Vesicula seminalis tarafından üretilir. Sitrik asit, spermatozoa tarafından besin olarak kullanılamaz. Seminal plazmadaki kesin rolü henüz bilinmemesine rağmen plazmadaki kalsiyumun bağlanmasında rol aldığı sanılmaktadır.

Fruktoz: Birçok hayvan türünde fruktoz vezikula seminalis tarafından üretilir. Testis ve epididimis tarafından üretilmez. Spermatozoonların fruktoz ile teması ejakulasyon sırasında ve vezikula seminalis bezinin salgı yapmasıyla olur. Salgı spermatozoon ile temasa geçince difüzyon yoluyla fruktoz hücre içine geçer. Bu andan itibaren fruktolizis başlar ve bir dizi olaylar geçirerek laktik asit meydana gelir.

Seminal plazma spermatozoonlardan difüzyon yoluyla geçen kimi enzimleri içerir. İlk saptanan enzimler fosfotazlardır. Fosfotazlar alkali ve asidik olmak üzere iki gruba ayrılır. Fosfotaz aktivitesi beslenme durumuyla, testiküler dejenerasyonla

ve hipoplaziden etkilenir. Ayrıca seminal plazmada glutamik oksaloasetik transaminaz, glutamik piruvik transaminaz ve laktik dehidrogenaz gibi enzimler de bulunmaktadır. (İleri ve ark., 1996).

İçerik (mg/100ml)	Teke Seminal Plazması*	Koç Seminal Plazması	Boğa Seminal Plazması**	Kan Plazması
Sodyum	123***	250	259	318
Potasyum	211***	140	172	17
Kalsiyum	7,5***	6	37	8
Magnezyum	5***	6	8	2
Klor	-	-	371	331
İnorganik fosfor	-	37,5	8	7
Gliserilfosforil kolin	809	2100	182	Yok
Protein	5000	5000	5500	8997
Glukoz	Eseri	Eseri	10	83
Fruktoz	875(677***)	250	550	Eseri
Laktik asit	73	16	35	13
Glutamik asit	-	-	3	7
Üre	-	-	34	36
Osmolarite	İzotonik	İzotonik	İzotonik	İzotonik

Çizelge 1.1. Teke, Boğa ve Koç Seminal Plazmalarının İçeriği (* Mendoza ve arkadaşlarından (1989); **Mann'dan (1981); ***Dündar ve arkadaşlarından (1983))

1.2.3. Seminal Plazmanın Spermadaki Payı

Seminal plazmanın sperma içindeki hacimsel payı ve bileşenleri türe özgü olarak değişim göstermektedir. Örneğin kanatlılarda seminal plazma yok denecek kadar azdır. Çünkü kanatlıların erkekleri eklenti bezlerinden yoksundur. Sadece kan damarlarından bir miktar serum spermanın içine karışır. Bu nedenle spermatozoon yoğunluğu çok yüksektir. Dolayısıyla kanatlı sperması bir hayli kıvamlı ve yapışkan tabiattadır. Teke ve koç ejakulatının miktarı 0,7 ile 2 ml arasında değişim göstermektedir ve göreceli olarak daha yüksek spermatozoon konsantrasyonuna (2 ila 5 milyar/ml) sahiptir. Yüksek devirlerde santrifüj sonucunda elde edilen verilere göre ejakulatın yaklaşık 1/4 ile 1/3 kısmını spermatozoa; geri kalan 3/4 ile 2/3 lük

kısmını ise seminal plazma teşkil eder. Teke ejakulatındaki oranlar ve sayısal veriler koçunkiyile benzerlik gösterir. Boğada ise ejakulat miktarı 4 ml ve üzerinde iken yoğunluğu teke ve koçunkinin üçte biri kadardır (1 milyar/ml civarında). Boğa ejakulatının 7/8 ile 5/6 sını seminal plazma oluşturur. Domuzda ejakulat miktarı 500 ml civarındadır ve bunun çok büyük bir kısmı seminal plazmayı kapsar. Domuz spermasının yoğunluğu bu nedenle 100 milyon/ml civarındadır. İnsanda ise ejakulat hacmi 3 ml civarında olup yoğunluk genellikle 100 milyonun/ml'nin altındadır. Spermanın yalnızca 1/20 oranındaki kısmını spermatozoonlar oluşturur. Bir genelleme yapmak gerekirse memeli hayvanlarda spermanın büyük payını seminal plazma oluştur (Mann, 1981).

Bu çalışmanın amacı, Ankara Tekesi seminal plazmasının dondurma öncesi ayrılmasının çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkisini ortaya koymak, seminal plazmanın ayrılmasında kullanılan yıkama solüsyonun bu parametreler üzerine etkisini belirlemek ve dondurma esnasında kullanılan Tris Yumurta Sarısı Gliserol sulandırıcısına belirli oranlarda boğa veya koç seminal plazmasının eklenmesinin çözüm sonu spermatolojik parametrelere etkisini saptamaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan yaşları 24 ay ve üzerindeki 4 baş Ankara (Tiftik) Tekesi kullanılmıştır. Ayrıca koç ve boğa seminal plazmalarının eldesi amacıyla, 4 baş Akkaraman ırkı koçtan ve bir holştayn ırkı boğadan yararlanılmıştır.

2.2. Hayvanların Bakım ve Beslenmesi

Çalışmada kullanılan Ankara Tekeleri, çalışma boyunca Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Çiftliği küçük baş hayvan ünitesinde sürüden ayrı olarak özel bir bölmede barındırılmıştır. Tekeler çalışma öncesinde sağlık kontrolünden geçirilmiş; paraziter enfestasyona karşı antiparaziter sağaltım uygulanmıştır. Hayvanlara günlük olarak ihtiyaçlarına uygun rasyonlar ve taze su verilmiştir. Hayvanların barındırıldığı bölmeler haftalık olarak temizlenmiş ve dezenfeksiyonu sağlanmıştır.

2.3. Boğa ve Koç Seminal Plazmalarının Eldesi

Bu araştırmada kullanılan koç ve boğaya ait seminal plazma, boğa ve koçtan suni vajenle alınan spermaların 5000 g'de 15 dakika süreyle santrifüj işleminden geçirildikten sonra üst sıvı kısımlarının (süpernatant) alınmasıyla elde edilmiştir. Bu yolla elde edilen koç ve boğa seminal plazmaları, plastik tüpler içinde -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.4. Çalışmada Kullanılan Sulandırıcı ve Yıkama Solüsyonları

Teke spermasının yıkanarak seminal plazmasından uzaklaştırılması amacıyla, TALP ve RİNGER olmak üzere iki farklı yıkama solüsyonu kullanılmıştır.

TALP Yıkama Solüsyonun Formülü:

NaCl	1.168g
KCl	0.0462g
NaHCO ₃	0.4200g
Laktik asit	0.807ml
NaH ₂ PO ₄	0.0070g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.0617g
MgCl ₂ .6H ₂ O	(100 mM stok solüsyondan 3ml)
Hepes (asit)	0.4766g

Distile su ile 200 ml'ye tamamlanarak Sperm-Talp yıkama solüsyonu hazırlanmıştır.

RİNGER Yıkama Solüsyonun Formülü:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
CaCl ₂	0.2 g
MgSO ₄	0.2 g
NaHCO ₃	1.0 g
Glikoz	1.0g

Bidistile suyla 1000 ml'ye tamamlanarak Ringer solüsyonu hazırlanmıştır.

Teke spermasının dondurulması amacıyla sulandırıcı olarak %7 gliserol ve %20 yumurta sarısı içeren Tris-sitrik asit-glukoz sulandırıcısı kullanılmıştır. Bu amaçla önce Tris-sitrik asit-glikoz stok solüsyonu hazırlanmıştır. Ana stok solüsyonun formülü:

Trisma Base	36,3 g
-------------	--------

Sitrik Asit	18,2 g
Glikoz	5,0 g

Bidistile suyla 1000 ml'ye tamamlanarak Tris-Sitrik asit-glikoz solüsyonu hazırlanmıştır. Elde edilen sulandırıcıya %7 gliserol ve %20 yumurta sarısı eklenmiştir. Tris Yumurta sarısı Gliserol sulandırıcısına (TYG) %5 koç seminal plazması eklenerek koç seminal plazması içeren TYG (K-TYG); %5boğa seminal plazması ekleyerek boğa seminal plazması içeren TYG (B-TYG) ve seminal plazma eklemeyerek de seminal plazma eklenmemiş TYG (TYG) olmak üzere üç farklı dondurma amaçlı sulandırıcı elde edilmiştir.

2.5. Spermanın Alınması

Teke sperması 4 adet tekedan dişi varlığında suni vajen ile alınmıştır. Fantom olarak dişi Ankara Keçisi kullanılmıştır. Çiftleşme sezonu boyunca düzenli olarak tekelerden haftada en az iki kez suni vajenle sperma alınmıştır.



Resim 2.1. Ankara Tiftik Tekesinden sperma alma aşamaları ve kadeh içinde sperma.

2.6. Ankara Tekesi Spermasının Seminal Plazmasından Ayrılması, Sulandırılması ve Elde Edilen Gruplar

Tekelerden alınan ejakulatlardan makroskopik olarak normal olanlar pastör pipetleriyle sperma toplama kadehlerinden alınarak deney tüplerinde birleştirilmiştir.

Dört farklı Ankara Tekesinden elde edilen spermalar deney tüpünde birleştirilip karışım elde edildikten sonra, üç gruba ayrılmıştır. İlk grup teke sperması her hangi bir yıkama işleminden geçirilmeksizin doğrudan %7 gliserol içeren Tris-sitrik asit-glukoz yumurta sarısı sulandırıcısı ile payette 50 milyon motil spermatozoon olacak şekilde sulandırılarak equilibrasyon işlemini takiben sıvı azot buharında (-110/-130 °C) dondurulmuştur. İkinci grup sperma TALP solüsyonuyla 1:10 sulandırılmış ve eşit hacimde olacak şekilde üç santrifüj tüpüne dağıtılmıştır. Üçüncü grup spermada benzer şekilde ancak RİNGER solüsyonuyla 1:10 sulandırıldıktan sonra eşit hacimlerde olacak şekilde üç farklı santrifüj tüpüne ayrılmıştır. Toplam 6 adet santrifüj tüpünde 1:10 oranında sözü edilen solüsyonlarla sulandırılmış teke sperması 600 g'de 15 dakika santrifüj işleminden geçirilmiştir. Santrifüj işleminin (yıkamanın) bitimini takiben teke seminal plazmasını içeren üst duru kısım (süpernatant) pastör pipeti yardımıyla uzaklaştırılmış ve santrifüj tüplerinin dibinde kalan peletler, koç seminal plazması (%5) boğa seminal plazması(%5) eklenmiş ve seminal plazma eklenmemiş (%0) %7 gliserol içeren Tris-sitrik asit-glukoz yumurta sarısı (%20) sulandırıcısı kullanılarak, her payette 50 milyon motil spermatozoon olacak şekilde sulandırılmış, 0,25 ml'lik payetlere çekilmiştir. Payetler içinde bulunan teke sperması equilibrasyon işleminin tamamlanması amacıyla +5°C de 2 saat tutulduktan sonra, sıvı azot seviyesinin 4-7 cm üzerinde (-110/-130°C de) sıvı azot buharında 15 dakika süreyle dondurulmuştur. Dondurma işlemini takiben, payetler sıvı azot içine daldırılmıştır. Payetler spermatolojik değerlendirilmelerin yapılacağı güne kadar sıvı azot tankında (sıvı azot içinde) saklanmıştır. Böylece birisi kontrol olmak üzere 7 çalışma grubu oluşturulmuştur.



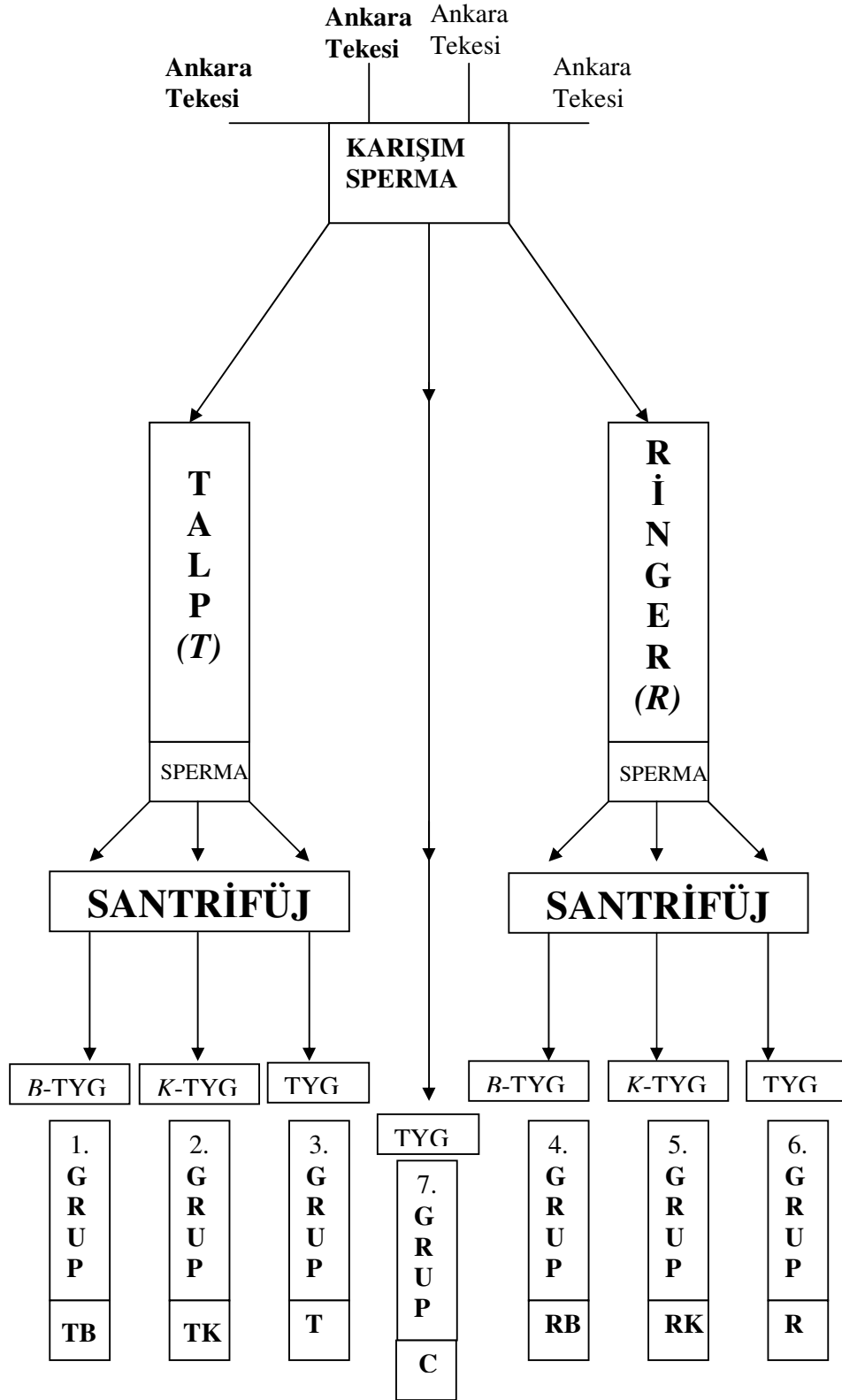
Resim 2.2. Ankara (Tiftik) Tekesi spermasının yıkanarak seminal plazmasından ayrılması: İki eşit hacimdeki spermanın Talp ve Ringer yıkama solüsyonuyla 1:10 sulandırılarak; eşit hacimlerde üçerli şekilde santrifüj tüplerine ayrılması (yıkama (santrifüj) öncesi sperma-yıkama solüsyonu süspansiyonu) (a), Santrifüj işlemi (b), Yıkama (santrifüj) sonrası görünüm, seminal plazmayı içeren süpernatant(c-d) ve tüpün dibindeki pelet (d).

Çalışmadaki Gruplar: Yukarıda belirtilen iki farklı yıkama solüsyonun(teke seminal plazmasının ayrılması için Talp ve Ringer solüsyonuyla yapılan santrifüj işlemi) ve dondurma amacıyla 3 farklı sulandırıcının (B-TYG, K-TYG, TYG) kullanılmasıyla 6 farklı araştırma grubu elde edilmiştir. Herhangi bir işlem uygulanmaksızın boğa veya koç seminal plazması içermeyen TYG solüsyonuyla sulandırıldıktan sonra dondurulan grubun da (kontrol grubunun da) eklenmesiyle toplam 7 çalışma grubu elde edilmiştir. Bu çalışma içinde yer alan gruplar:

1. Grup(TB): Seminal plazmasından ayrılması amacıyla, Talp solüsyonuyla yıkama işlemi (600g 15 dakika) gerçekleştirilmiş ve Boğa seminal plazması içeren Tris Yumurta sarısı (%20) Gliserol (%7) (B-TYG) ile sulandırıldıktan

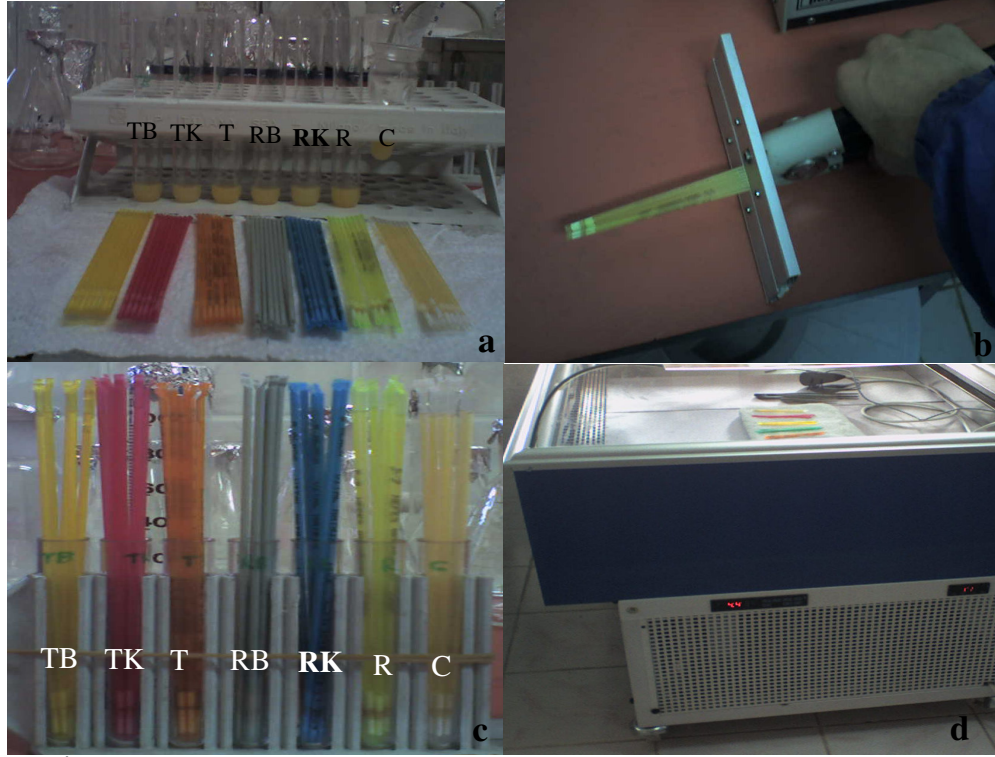
sonra payetlere çekilmiş ve equilibasyona (+5°C de 2 saat) bırakılmış teke spermasını,

2. Grup(TK): Seminal plazmasından ayrılması amacıyla, Talp solüsyonuyla yıkama işlemi(600g 15 dakika) gerçekleştirilmiş ve Koç seminal plazması içeren TYG (K-TYG) ile sulandırıldıktan sonra payetlere çekilmiş ve equilibasyona bırakılmış teke spermasını,
3. Grup(T): Seminal plazmasından ayrılması amacıyla, Talp solüsyonuyla yıkama işlemi (600g 15 dakika) gerçekleştirilmiş ve her hangi bir seminal plazma içermeyen TYG ile sulandırıldıktan sonra payetlere çekilmiş ve equilibasyona bırakılmış teke spermasını,
4. Grup(RB): Seminal plazmasından ayrılması amacıyla, Ringer solüsyonuyla yıkama işlemi(600g 15 dakika) gerçekleştirilmiş ve Boğa seminal plazması içeren TYG (B-TYG) ile sulandırıldıktan sonra payetlere çekilmiş ve equilibasyona bırakılmış teke spermasını,
5. Grup(RK): Seminal plazmasından ayrılması amacıyla, Ringer solüsyonuyla yıkama işlemi(600g 15 dakika) gerçekleştirilmiş ve Koç seminal plazması içeren TYG (K-TYG) ile sulandırıldıktan sonra payetlere çekilmiş ve equilibasyona bırakılmış teke spermasını,
6. Grup(R): Seminal plazmasından ayrılması amacıyla, Ringer solüsyonuyla yıkama işlemi (600g 15 dakika) gerçekleştirilmiş ve her hangi bir seminal plazma içermeyen TYG ile sulandırıldıktan sonra payetlere çekilmiş ve equilibasyona bırakılmış teke spermasını,
7. Grup(Kontrol-C): Yıkama işlemi uygulanmaksızın, her hangi bir seminal plazma içermeyen TYG ile sulandırılarak payetlere çekilmiş ve equilibasyona bırakılmış teke spermasını içermiştir.



ŞEKİL 2.1. ÇALIŞMA İÇİNDEKİ GRUPLARIN OLUŞTURULMASI

B-TYG: Boğa seminal plazması (%5) içeren Tris Yumurta Sarısı (%20) Gliserol (%7)
 K-TYG: Koç seminal plazması (%5) içeren Tris Yumurta Sarısı (%20) Gliserol (%7)



RESİM 2.3. Santrifüj sonrası, yıkanmış Ankara Tekesi spermasının Boğa seminal plazması(%5), Koç seminal plazması (%5) içeren ve içermeyen Tris Yumurta Sarısı (%20) Gliserol (%7) Sulandırıcısıyla sulandırılarak payetlere çekilmesi (a), payetlerin açık ucunun kapatılması (b-c) ve equilibrasyon işlemine geçilmesi(d).

Adları, TB (1.Grup), TK (2.Grup), T (3.Grup), RB (4.Grup), RK (5.Grup), R (6.Grup) ve C (7.Grup) olarak kısaltılan bu 7 grup teke sperması equilibrasyon işleminin (+5°C'de 2 saat) ardından, sıvı azot seviyesinin 4-7 cm üzerinde sıvı azot buharında 15 dakika süreyle dondurulmuştur. Dondurma işlemini takiben 7 gruba ait spermayı içeren payetler sıvı azot içine daldırılmış ve spermatolojik parametrelerin değerlendirileceği güne kadar sıvı azot içinde (sıvı azot tankında) saklanmıştır.



RESİM 2.4. Ankara Tekesi spermasının sıvı azot buharında dondurulması (a); dondurma sonrası çalışma gruplarına ait payetlerin sıvı azot içine atılması (b); donma işlemi tamamlanmış Ankara Tekesi spermasının sıvı azot tankına aktarımı (c) ve spermatolojik değerlendirmeye kadar sıvı azot tankında saklanması (d)

2.7. Spermatolojik Parameterelerin Değerlendirilmesi

Gerçekleştirilen çalışmada öncelikle dört Ankara Tekesinden alınan spermaların karıştırılmasıyla elde edilen miks ejakulatın miktarı (ml), kaynama hareketi(1-5), motilitesi (%), anormal spermatozoa oranı (%), ölü spermatozoa oranı (%) ve yoğunluğu ($10^9/\text{ml}$) belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilen işlemlerden geçirilerek, payetlerde dondurulan ve sıvı azot içinde tutulan 7 farklı çalışma grubuna ait spermalar ise $+40^\circ\text{C}$ 'lik su banyosunda 20 saniyede çözdürüldükten sonra; spermatozoa motiliteleri(%), anormal spermatozoa oranı(%), ölü spermatozoa oranı (%) ve Hipo-ozmotik şişme testi (HipoOsmotik Swelling Test-HOS test-%) parametreleri bakımından değerlendirilmiştir.

2.8. Spermatolojik Değerlendirme Parametreleri

2.8.1. Miktar

Dört Ankara Tekesinden alınan spermalar dereceli bir tüpte birleştirilmiş ve miktar ml olarak kaydedilmiştir.

2.8.2. Motilite

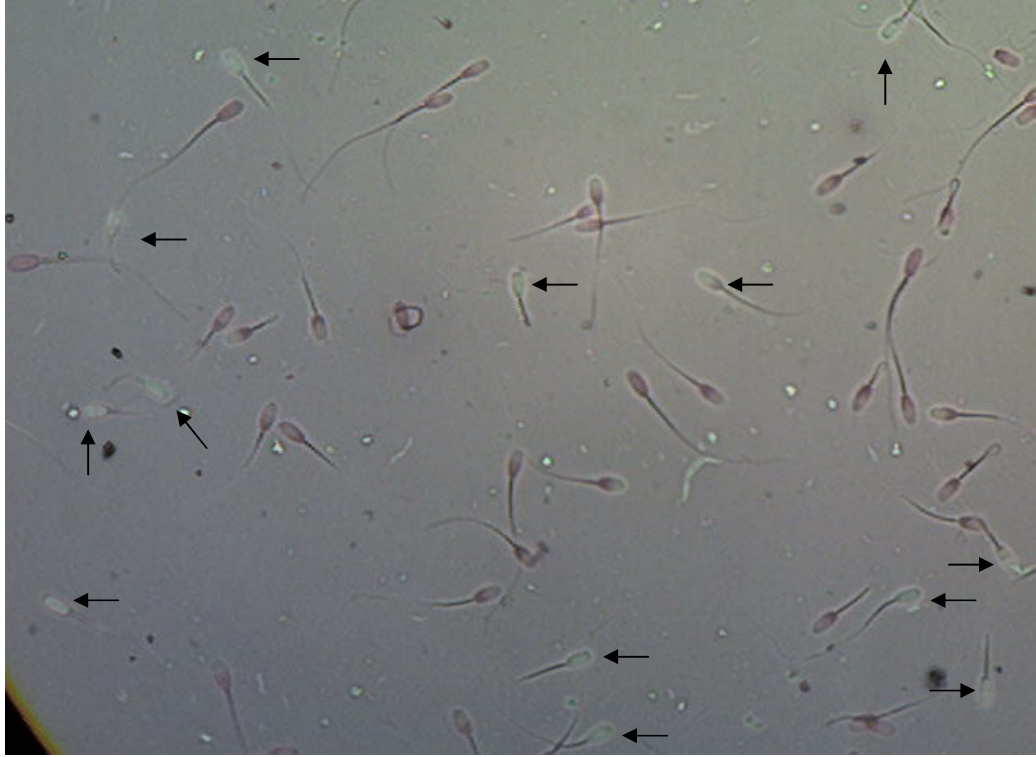
Motilite tayini amacıyla, spermadan küçük bir damla lam üzerine konulduktan sonra sperma damlasının üzerine lamel kapatılmış ve ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta x200 büyütmede muayene edilmiştir. Motilitenin belirlenmesine yönelik olarak, en az üç mikroskop alanında değerlendirme yapılmış ve bir yönde düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların aynı alandaki tüm spermatozoonlara yüzde (%) oranı şeklinde motilite tespit edilerek kaydedilmiştir.

2.8.3. Ölü-Canlı Spermatozoa Oranı

Natif ve çalışma içinde bulunan gruplara ait spermalarda ölü-canlı spermatozoa oranının belirlenmesinde Eosin boyama testinden yararlanılmıştır. Testte Eosin boyasının, %3'lük sodyum sitratla hazırlanmış %2'lik konsantrasyonu kullanılmıştır. Temiz bir lam üzerine konulan bir damla sperma örneği eşit büyüklükte Eosin

boyasıyla karıştırılarak hemen sürme preparat (froti) hazırlanmış ve tespit amacıyla, hazırlanan sürme preparatlar sıcak tablada hızla kurutulmuştur.

Bu yöntemle hazırlanan sürme preparatlar mikroskop altında x400 büyütmede 400 spermatozoon sayılarak değerlendirilmiş ve ölü spermatozoa oranı % olarak belirlenmiş ve kaydedilmiştir. Sürme preparatların değerlendirilmesinde; baş kısmı boya almamış spermatozoonlar canlı, baş kısmı boya almış olanlar ise ölü olarak kabul edilmiştir.



Resim 2.5. Ölü ve canlı spermatozoonlar (eozin boyama-sürme preparat). Canlı spermatozoonlar eozin boyayı almamakta ve baş kısmı açık renkte görülmektedir (oklar). Ölü spermatozoonlar ise membran geçirgenliği bozulduğundan boyayı almakta ve daha koyu renkte görülmektedir.

2.8.4. Anormal Spermatozoa Oranı

Sperma numunelerinde anormal spermatozoa oranı sıvı tespit yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Tespit amacıyla içeriği aşağıda belirtilen Hancock solüsyonu (Hancock, 1952) kullanılmıştır.

Hancock solüsyonu:

1. Solüsyon:	NaCl	9 g
	Bidistile su ad.	500 ml
2. Solüsyon: A)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	21,682 g
	Bidistile su ad.	500 ml
B)	KH_2PO_4	22,254 g
	Bidistile su ad.	500 ml

200 ml A ile 80 ml B karıştırılarak 2. solüsyon hazırlanır.

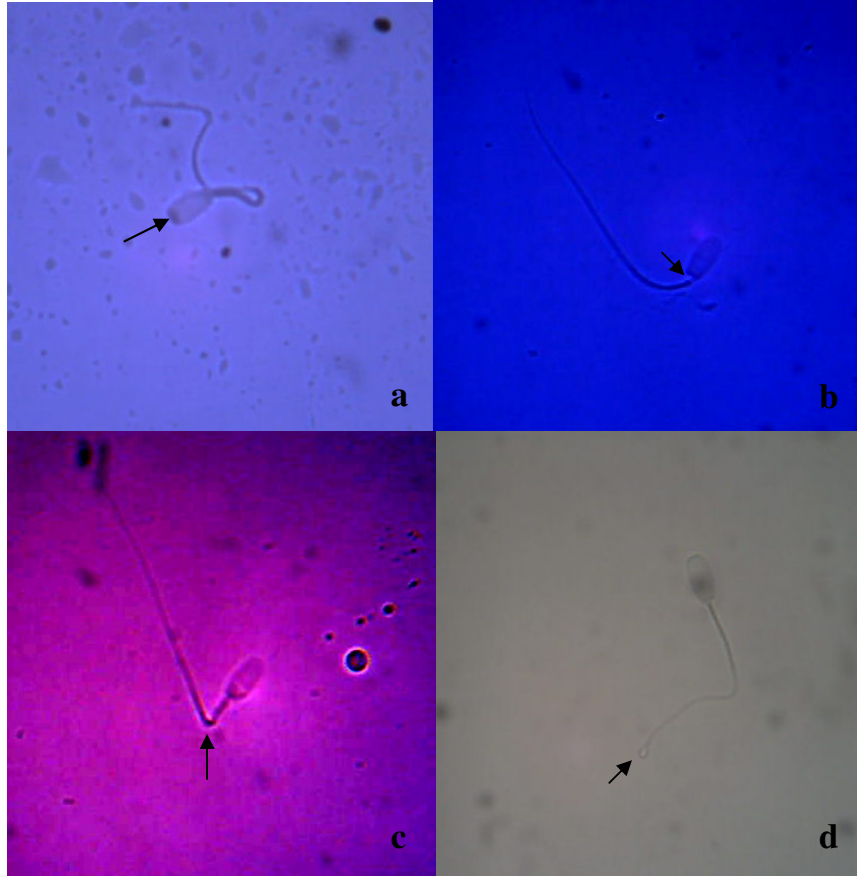
500 ml Hancock solüsyonu eldesi;

Formalin	62,5 ml
1. Solüsyon	150 ml
2. Solüsyon	150 ml

Bidistile su ile 500 ml'ye tamamlanarak stok solüsyon hazırlanmıştır.

Çalışmada 0,5 ml Hancock solüsyonu içeren kapaklı ependorf tüpü içerisine bir damla sperma numunesi damlatılarak fiksasyon sağlanmış ve anormal spermatozoa oranı belirlenene kadar ependorf tüpleri buzdolabında (+4°C) saklanmıştır.

Anormal spermatozoa oranının belirlenmesinde; Hancock solüsyonunda tespit edilen sperma numunesinden temiz bir lam üzerine damlatılan spermanın üzerine lamel kapatılmıştır. Daha sonra daldırma objektif altında (x1000) en az 400 spermatozoon incelenmesi sonunda anormal yapı sergileyen spermatozoa oranı % olarak belirlenmiştir.



Resim 2.6. Anormal spermatozoa örnekleri. Dejenere akrozoma sahip spermatozoon (a), baş ve orta kısım arasında kopma oluşmuş spermatozoon(b), orta kısmın distalinden kıvrılmış kuyruğa sahip spermatozoon(c), kuyruğun uç kısmı kıvrılmış spermatozoon(d).

2.8.5. Yoğunluk

Natif karışım ejakulatın yoğunluğunun saptanmasında hemositometrik yöntemden yararlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar $\times 10^9/\text{ml}$ olarak kaydedilmiştir (Smith ve Mayer, 1955).

Spermalardan alınan numunelerin sulandırılması amacıyla aşağıda formülü belirtilen Hayem eriyiği kullanılmıştır.

Hayem eriyiği:

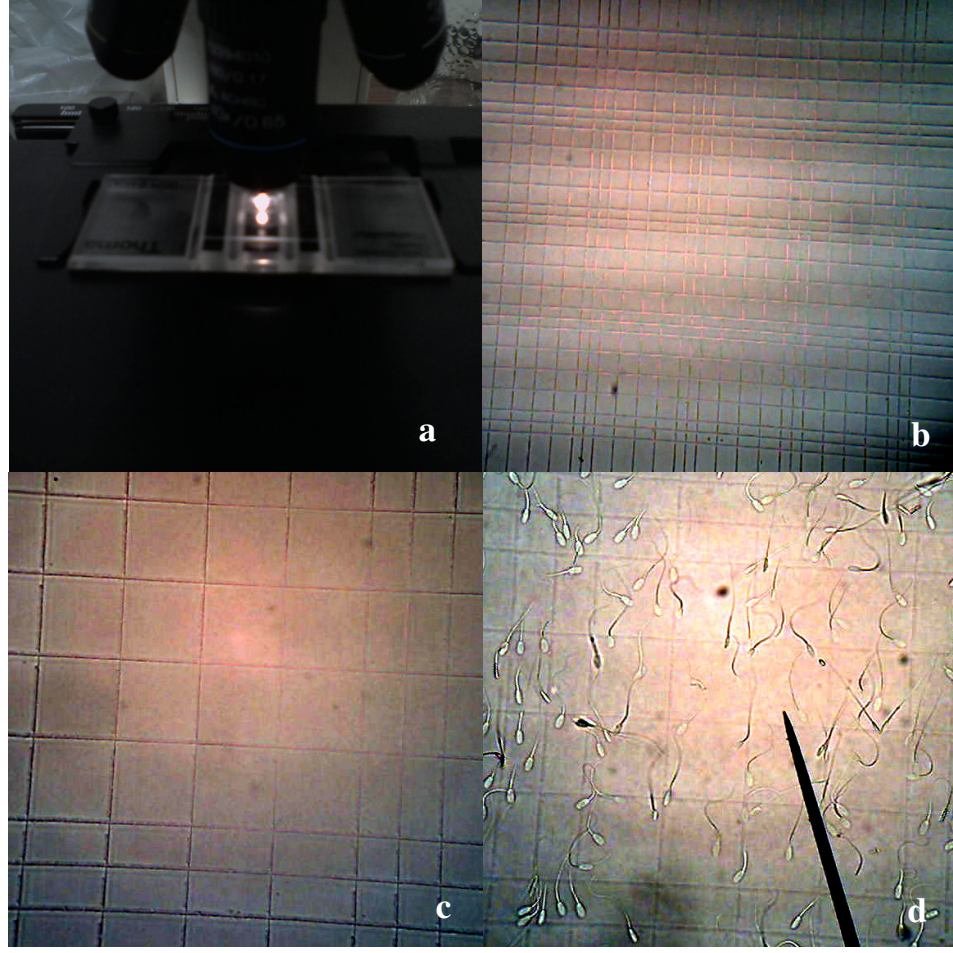
Sodyum sülfat	5,0 g
Sodyum klorür	1,0 g
Civa klorür	0,5 g
Bidistile su	200,0 ml

Natif karışım spermalardan alınan numunelerin sulandırılması için 5 ml Hayem solüsyonu içeren tüplerden 0,01 ml solüsyon otomatik pipet yardımı ile atılmış ve içerisine 0,01 ml sperma numunesi konulmuştur. Böylelikle natif karışım sperma örnekleri 1/500 oranında sulandırılmıştır.

Thoma lamında sayımların gerçekleştirilmesinden sonra yoğunluk hesaplaması aşağıda verilen formüle göre yapılmıştır.

$$\text{Sayılan Hücre Sayısı (n)} \times 1000$$

$$\text{Yoğ.}(10^9/\text{ml}) = \frac{\text{Sayılan Büyük Kare (10)} \times \text{Büyük Kare Hacmi (1/250}\mu\text{l)} \times \text{Sulandırma Oranı (1/500)}}{1}$$



Resim 2.7. Ankara Tekesi spermasında yoğunluk tayini. Lameli kapatılmış Thoma lamı (a), Thoma lamının bir kamarasının mikroskop altındaki görünümü (küçük büyütmede) (b), bir büyük karenin görünümü (orta büyütme) (c) ve bir büyük kare içindeki spermatozoonlar (d).

2.8.6. HipoOsmotik Swelling (HOS) Test Analizi

Çalışma içinde bulunan gruplara ait spermalardan çözüm sonrası 0,100 ml alınarak, benmarideki (37°C) deney tüpü içinde bulunan 0,900 ml 100 mM'lık fruktoz solüsyonu içene katılarak karıştırılmış ve 5 dakika bekletildikten sonra, lam üzerine bir damla alınarak sürme preparat hazırlanmış ve ısıtma tablası üzerinde fikse edilmiştir (Leboeuf ve ark., 2005).

Hazırlanan sürme preparatlar mikroskop altında (x400) incelenerek en az 400 hücre sayılmış ve kuyruktaki kıvrılmalar dikkate alınarak HOS teste yanıt veren spermatozoonlar % olarak belirtilmiştir.



Resim 2.8. Ankara Tekesi spermasında Hipoosmotik sıvıya değişik şekillerde yanıt vermiş spermatozoonlar (a,b,c) ve hipoosmotik sıvıya yanıt vermemiş spermatozoon (d).

2.9. İstatistik Analiz

Değişkenler ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Gruplar arasında farklılık olup olmadığını anlamak için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Analiz sonucunda farklılık bulunduğunda, farklılığı yaratan grupları belirlemek amacıyla DUNCAN ikili karşılaştırma testi yapılmıştır. Ayrıca iki yıkamanın alt grupları arasındaki farklılığın ortaya konması için de Mann-Whitney U test uygulanmıştır.

3.BULGULAR

3.1. Taze Spermanın Spermatolojik Parametreleri

Yaşları 24 ay ve üzeri 4 Ankara Tiftik Tekesinden suni vajen ile alınan spermalar, dereceli bir tüpte birleştirilerek karışım hale getirildikten sonra, taze spermanın spermatolojik özellikleri değerlendirilmiştir. Karışım spermanın miktarı en fazla 5 ml en düşük 3 ml ve ortalama $3,95 \pm 0,52$ ml olarak kaydedilmiştir. Motilite oranı ise en yüksek % 85 en düşük %65 ve ortalamada ise $76 \pm 5,67$ olarak tespit edilmiştir. Karışım taze spermanın yoğunluğu en yüksek $4,2 \times 10^9/\text{ml}$, en düşük $2,2 \times 10^9/\text{ml}$ ve ortalama $3,03 \pm 0,61 \times 10^9/\text{ml}$ olarak belirlenmiştir. Anormal spermatozoa oranı en yüksek %16,5, en düşük %6 ve ortalama $9,875 \pm 3,89$ olarak belirlenmiştir. Akrozoma bağlı anormalliklerin oranı ortalama $0,9 \pm 0,84$ olarak kaydedilmiştir. Ölü spermatozoa oranı en yüksek % 21,25 en düşük % 9,75 ve ortalamada $13,1 \pm 4,13$ olarak bulunmuştur. HOS teste yanıt en yüksek % 76,25 en düşük 68,25 ortalama $70,875 \pm 3,05$ olarak belirlenmiştir. Taze spermadan elde edilen spermatolojik parametreler Çizelge 3.1.'de sunulmuştur.

Çizelge3.1.Ankara Tekesi karışım ejakulatlarında spermatolojik parametreler.

KARIŞIM SPERMA	Karışım sperma miktarı (ml)	MOTİLİTE (%)	ÖLÜ (%)	ANORMAL (%)	HOS test (%)	YOĞUNLUK ($10^9/\text{ml}$)	Akrozoma Bağlı Anormal (%)
DENEME1	4	75	13,5	15	68,25	2,2	1
DENEME2	4	80	12,25	5,5	72,75	2,89	0
DENEME3	4	80	9,75	6	70	3,31	0,75
DENEME4	3,5	85	5,25	6,25	76,25	2,6	1,25
DENEME5	3,5	75	14,5	10,75	71,75	4,2	0
DENEME6	4	70	16	16,5	65	2,9	2
DENEME7	5	75	11,5	6,5	72,5	3,6	0,75
DENEME8	4	75	13,75	9,75	69	3,5	0,75
DENEME9	3	65	21,25	12,5	70,75	2,7	2,5
DENEME10	4,5	80	13,25	10	72,5	2,4	0
ORTALAMA	3,95	76	13,1	9,875	70,875	3,03	0,9
STDSAPMA	0,522015	5,676462	4,130174	3,894886	3,057891	0,6154673	0,843274

3.2. Çalışma Gruplarının Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreleri

Ankara Tekelerinden alınan spermalar birleştirilerek karışım ejakulat haline getirildikten sonra, bir kısmı Talp solüsyonuyla, bir kısmı ise Ringer solüsyonuyla 1:10 oranında sulandırılmış ve santrifüj (yıkama) işlemi gerçekleştirilmiştir . Yıkama işlemiyle seminal plazmasından ayrılan teke sperması boğa seminal plazması, koç seminal plazması veya seminal plazma içermeyen Tris Yumurta Sarısı Gliserol sulandırıcısıyla sulandırılmış ve alıştırma işlemini takiben dondurulmuştur. Ankara tekesine ait payetler sıvı azot tankında saklanmıştır. Günü geldiğinde, deney gruplarına ait dondurulmuş teke sperması 40°C'lik su banyosunda 20 saniyede çözüldükten sonra bahsi geçen spermatolojik parametreler yönünden değerlendirilmiştir.

3.2.1. Motilite

Belirtilen sıcaklık ve sürede su banyosunda çözülen; Talp ile yıkama işlemi görmüş ve boğa seminal plazması içeren sulandırıcıyla belirtilen dozlarda sulandırıldıktan sonra dondurulmuş teke spermasının (Grup 1/TB), Talp ile yıkama işlemi görmüş ve koç seminal plazması içeren sulandırıcıyla belirtilen dozlarda sulandırıldıktan sonra dondurulmuş teke spermasının (Grup 2/TK), Talp ile yıkama işlemi görmüş seminal plazma içermeyen sulandırıcıyla belirtilen dozlarda sulandırıldıktan sonra dondurulmuş teke spermasının (Grup 3/T), Ringer ile yıkama işlemi görmüş ve boğa seminal plazması içeren sulandırıcıyla belirtilen dozlarda sulandırıldıktan sonra dondurulmuş teke spermasının (Grup 4/RB), Ringer ile yıkama işlemi görmüş ve koç seminal plazması içeren sulandırıcıyla belirtilen dozlarda sulandırıldıktan sonra dondurulmuş teke spermasının (Grup 5/RK), Ringer ile yıkama işlemi görmüş ve seminal plazma içermeyen sulandırıcıyla belirtilen dozlarda sulandırıldıktan sonra dondurulmuş teke spermasının (Grup 6/R) ve kontrol olarak, herhangi bir yıkama

işlemi görmeksizin doğrudan seminal plazma içermeyen sulandırıcıyla belirtilen dozlarda sulandırıldıktan sonra dondurulmuş teke spermasının (Grup 7/C), çözüm sonu ısıtma tablalı mikroskop ile bakısından elde edilen motilite sonuçlarının ortalama değerleri sırasıyla $37 \pm 2,134$, $49,5 \pm 3,023$, $34,5 \pm 2,522$, $35,5 \pm 3,023$, $33,5 \pm 4,372$, $22,5 \pm 3,354$ ve $25,5 \pm 2,930$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Çözüm sonu çalışma gruplarına ait motilite oranları.

MOTİLİTE (%)	Grup1 (TB)	Grup2 (TK)	Grup3 (T)	Grup4 (RB)	Grup5 (RK)	Grup6 (R)	Grup7(C) Kontrol
Deneme1	30	35	40	40	60	10	30
Deneme2	40	45	35	20	35	20	30
Deneme3	40	55	35	45	25	10	15
Deneme4	35	40	50	40	15	45	30
Deneme5	30	50	25	35	15	20	30
Deneme6	45	55	35	45	40	30	25
Deneme7	35	50	25	30	20	20	40
Deneme8	50	60	40	45	50	25	30
Deneme9	30	40	25	35	30	15	10
Deneme10	35	65	35	20	45	30	15
X	37	49,5	34,5	35,5	33,5	22,5	25,5
Sx	2,134	3,023	2,522	3,023	4,372	3,354	2,930

Talp ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş teke spermasının alt gruplarına bakıldığında Grup 1(TB) ile Grup 3 (T) arasındaki farkın önemli olmadığı ($P>0,05$); Grup 2 (TK) ile kontrol (Grup 7/C) ve diğer gruplar (Grup 1/TB ve Grup 3/T) arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Grup 1 (TB) ve Grup 3 (T) ile kontrol grubunun değerleri arasında önemli fark olduğu da saptanmıştır($P<0,05$).

Çizelge 3.3. Talp yıkama alt gruplarının çözüm sonu motiliteleri ve farkların önemliliği.

	N	Alt Sınır	Üst Sınır	Motilite (%)
Grup1 (TB)	10	30	50	$37^b \pm 2,134$
Grup2(TK)	10	35	65	$49,5^c \pm 3,023$
Grup3(T)	10	25	50	$34,5^b \pm 2,522$
Grup7(C)	10	10	40	$25,5^a \pm 2,930$

a, b, c : Farklı harfler grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğunu belirtir ($P<0,05$).

Ringer ile yıkanma işlemi uygulanmış teke spermasının alt gruplarına bakıldığında ise Grup 4 (RB) ile Grup 5 (RK) arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir.

Grup 4 (RB), Grup 5(RK) ve Grup 6 (R)'nın kontrol grubu olan Grup 7(C) ile arasındaki farkın önemlilik göstermediği saptanmıştır($P>0,05$). Grup 4 (RB) ve Grup 5 (RK)'in Grup 6 (R) ile aralarındaki farkın önemli olduğu ortaya konmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 3.4. Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu motiliteleri ve farkların önemliliği.

	N	Alt Sınır	Üst Sınır	Motilite (%)
Grup1 (RB)	10	20	45	35,5 ^b ±3,023
Grup2(RK)	10	15	60	33,5 ^b ±4,372
Grup3(R)	10	10	45	22,5 ^a ±3,354
Grup7(C)	10	10	40	25,5 ^{ab} ±2,930

a, b, c : Farklı harfler grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğunu belirtir ($P<0,05$).

İki farklı yıkamanın grupları bir biriyle karşılaştırıldığında, TB ile RB arasındaki fark önemli bulunmazken ($P>0,05$); TK ile RK ve T ile R grupları arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge3.5. Talp ve Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu motilite oranları farkının önemliliği.

	N	Motilite(%)	Kesin önem	P
Grup1(TB)	10	37	1,000	>0,05
Grup4(RB)	10	35,5		
Grup2(TK)	10	49,5	0,010	<0,05
Grup5(RK)	10	33,5		
Grup3(T)	10	34,5	0,009	<0,05
Grup6(R)	10	22,5		

3.2.2. Ölü Spermatozoa Oranı

Gruplardaki ölü spermatozoa oranlarına bakıldığında, Grup 1 (TB), Grup 2(TK), Grup 3(T), Grup 4(RB), Grup 5(RK), Grup 6(R) ve Grup 7(Kontrol/C) için sırasıyla % 52,6±2,71, %36,9±1,84, %54,65±3,82, %53,87±3,23, %55±5,21, %66,32±4,14, %61,15±4,40 olarak saptanmıştır.

Çizelge 3.6. Çözüm sonu ölü spermatozoa oranları.

ÖLÜ (%)	Grup1 (TB)	Grup2 (TK)	Grup3 (T)	Grup4 (RB)	Grup5 (RK)	Grup6 (R)	Grup7(C) Kontrol
Deneme1	45,5	39,25	40	38,75	25	55	42,25
Deneme2	39,5	31,75	38,25	50	38,5	47,75	45
Deneme3	57,25	42	63,5	51,5	69,75	82,5	76
Deneme4	55,25	38,5	42,75	45,25	67,75	47,5	52,5
Deneme5	61,5	36	72,75	58,75	83,25	81,5	55,25
Deneme6	53,25	42,75	56,75	49,25	50	65,5	72,25
Deneme7	56,5	34	70	65,75	70,5	72,25	47,5
Deneme8	39,75	35,25	49	48,75	42,25	69,5	69,5
Deneme9	65	44,5	58,5	57	61,25	79,25	76,75
Deneme10	52,5	25	55	73,75	41,75	62,5	74,5
X	52,6	36,9	54,65	53,875	55	66,325	61,15
Sx	2,717	1,844	3,826	3,233	5,216	4,146	4,408

Talp yıkama grupları kendi içinde ve kontrol ile karşılaştırıldığında; Grup 1 (TB) ölü oranı ile Grup 2 (TK) ve Kontrol grubunun ölü spermatozoa oranları arasındaki fark önemli bulunurken ($P < 0,05$), Grup 3 (T) ile arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($P > 0,05$). Bu spermatolojik parametre açısından Grup 2 (TK) ile diğer gruplar arasındaki fark önemli iken ($P < 0,05$); Grup 3 (T) ile kontrol arasındaki farkın önemsiz olduğu ortaya konmuştur ($P > 0,05$).

Çizelge 3.7. Talp yıkama alt gruplarının çözüm sonu ölü spermatozoa oranları ve farkların önemliliği.

	N	Alt Sınır	Üst Sınır	Ölü (%)
Grup1 (TB)	10	39,5	65	52,6 ^b ±2,717
Grup2 (TK)	10	25	44,5	36,9 ^a ±1,844
Grup3 (T)	10	38,25	72,75	54,65 ^{bc} ±3,826
Grup7(C)	10	42,25	76,75	61,15 ^c ±4,408

a, b, c : Farklı harfler grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğunu belirtir ($P < 0,05$).

Ringer yıkama alt gruplarına bakıldığında Grup 4(RB), Grup 5(RK), Grup 6(R) ve Grup 7 (Kontrol) arasındaki farkların istatistiki önem göstermediği belirlenmiştir($P>0,05$).

Çizelge 3.8. Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu ölü spermatozoa oranları farkının önemliliği

	N	Alt Sınır	Üst Sınır	Ölü (%)
Grup1 (RB)	10	38,75	73,75	53,875 ^a ±3,233
Grup2(RK)	10	25	83,25	55 ^a ±5,216
Grup3(R)	10	47,75	82,5	66,325 ^a ±4,14
Grup7(C)	10	42,25	76,75	61,15 ^a ±4,408

a, b, c : Farklı harfler grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğunu belirtir ($P<0,05$).

Ölü spermatozoa oranı bakımından Talp ve Ringer yıkama gruplarını karşılaştırdığımızda; TB ve RB ile T ve R arasındaki farkın önemsiz olduğu kaydedilirken ($P>0,05$), TK ve RK arasındaki farkın önemli olduğu kayda geçilmiştir($P<0,05$).

Çizelge 3.9. Talp ve Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu ölü spermatozoa oranları farkının önemliliği.

	N	Ölü(%)	Kesin önem	P
Grup1(TB)	10	52,6	0,971	>0,05
Grup4(RB)	10	53,875		
Grup2(TK)	10	36,9	0,010	<0,05
Grup5(RK)	10	55		
Grup3(T)	10	54,65	0,089	>0,05
Grup6(R)	10	66,325		

3.2.3. Anormal Spermatozoa Oranı

Ortalama anormal spermatozoa oranları Grup1 (TB), Grup 2(TK), Grup 3(T), Grup 4 (RB), Grup 5 (RK), Grup 6 (R), Grup 7 (Kontrol/C) için sırasıyla %47,12±4,01, %32,3±4,20, %55,82±3,69, %52,82±2,94, %48,6±4,80, %67,85±4,80, %65,35±3,779 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.10. Çözüm sonu anormal spermatozoa oranları.

ANORMAL (%)	Grup1 (TB)	Grup2 (TK)	Grup3 (T)	Grup4 (RB)	Grup5 (RK)	Grup6 (R)	Grup7(C) Kontrol
Deneme1	71,75	51	42,75	59	29,5	72,5	53,75
Deneme2	47,5	45	59,5	53,25	49,25	71,25	74,25
Deneme3	44,75	29	63,75	54	65,5	91	68,25
Deneme4	44,25	27,25	46	54,5	53,25	42,5	53,25
Deneme5	49	36,75	70	47,25	75,5	75	66,5
Deneme6	36,75	30,25	61	59,75	48,5	72	69
Deneme7	30	9,75	39,5	31,75	21,5	49,5	44,5
Deneme8	39	31,5	50,25	46,25	47	59,25	65,75
Deneme9	65,5	47,25	74,25	65	62,25	85,75	85,75
Deneme10	42,75	15,25	51,25	57,5	33,75	59,75	72,5
X	47,125	32,3	55,825	52,825	48,6	67,85	65,35
Sx	4,010	4,209	3,696	2,942	4,805	4,803	3,466

Çözüm sonrası Talp ile yıkama uygulanmış spermanın alt gruplarına bakıldığında anormal spermatozoa oranı bakımından TB ile T arasındaki farkın önemli olmadığı ($P>0,05$) ancak TK ve kontrol ile farkın önemli olduğu kaydedilmiştir ($P<0,05$). TK ile TB, T ve kontrol (C) arasındaki fark anormal spermatozoa oranı açısından önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Anormal spermatozoa oranı açısından T ile TB ve Kontrol grubu arasındaki fark önemlilik göstermemiştir ($P>0,05$).

Çizelge 3.11. Talp yıkama alt gruplarının çözüm sonu anormal spermatozoa oranları ve farkların önemliliği.

	N	Alt Sınır	Üst Sınır	Anormal (%)
Grup1 (TB)	10	30	71,75	47,125 ^b ±4,010
Grup2(TK)	10	9,75	47,25	32,3 ^a ±4,209
Grup3(T)	10	39,5	74,25	55,825 ^{bc} ±3,696
Grup7(C)	10	44,5	85,75	65,35 ^c ±3,779

a, b, c : Farklı harfler grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğunu belirtir ($P<0,05$).

Ringer ile yıkama uygulanmış teke sperması göz önüne alındığında, RB ile RK arasındaki fark istatistiki açıdan önemli değilken ($P>0,05$); RB ile R ve Kontrol grubunun arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0,05$). RK ile R ve Kontrol arasındaki fark önemlilik göstermektedir ($P<0,05$). R ve Kontrol grubu arasındaki fark önemli değildir ($P>0,05$).

Çizelge 3.12. Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu anormal spermatozoa oranları ve farkların önemliliği.

	N	Alt Sınır	Üst Sınır	Anormal (%)
Grup1 (RB)	10	31,75	65	52,825 ^a ±2,942
Grup2(RK)	10	21,5	75,5	48,6 ^a ±4,805
Grup3(R)	10	42,5	91	67,85 ^b ±4,803
Grup7(C)	10	44,5	85,75	65,35 ^b ±3,779

a, b, c : Farklı harfler grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğunu belirtir ($P<0,05$).

Talp ve Ringer yıkamanın alt grupları karşılaştırıldığında, TB ile RB ve T ile R arasındaki fark önemli bulunmamıştır ($P>0,05$). TK ve RK arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$).

Çizelge 3.13. Talp ve Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu anormal spermatozoa oranları farkının önemliliği.

	N	Anormal(%)	Kesin önem	P
Grup1(TB)	10	47,125	0,165	>0,05
Grup4(RB)	10	52,825		
Grup2(TK)	10	32,3	0,024	<0,05
Grup5(RK)	10	48,6		
Grup3(T)	10	55,825	0,105	>0,05
Grup6(R)	10	67,85		

3.2.4. HipoOsmotik Sweling(Şişme) (HOS) Test Oranı

İki farklı yıkama işleminden geçirilerek boğa ve koça ait seminal plazma içeren ve içermeyen sulandırıcılarla belirtilen dozlarda sulandırılarak dondurulan Ankara Tekesi spermasının ve kontrol grubunun, çözüm sonu 100 mOsm'lük fruktoz solüsyonuna verdiği yanıt; Grup 1 (TB), Grup 2 (TK), Grup 3 (T), Grup 4 (RB), Grup 5 (RK), Grup 6 (R), Grup 7 (Kontrol/C) için sırasıyla %42,23±2,71, %49,35±3,59, %38,53±3,43, %40,88±2,34, %36,83±3,57, %25,43±3,89, %30,68±3,46 olmuştur.

Çizelge 3.14. Çözüm sonu Hipoosmotik Swelling (HOS) Test oranları.

HOST (%)	Grup1 (TB)	Grup2 (TK)	Grup3 (T)	Grup4 (RB)	Grup5 (RK)	Grup6 (R)	Grup7(C) Kontrol
Deneme1	30	21,25	34,25	43,75	48,75	14,5	41,5
Deneme2	45,25	60	50,75	32,5	52	12,5	52,25
Deneme3	45	52,5	28	28,75	23,75	14,25	30
Deneme4	30,5	45,25	54,5	51,25	20,75	52	23
Deneme5	34,75	50,75	21,75	48	20	17,25	16,5
Deneme6	48,25	50	29,5	41	48,75	22,5	22
Deneme7	52,5	57,5	46,75	48	36	33,25	40,5
Deneme8	51,25	54,75	38	43,5	46,75	30,75	28
Deneme9	36	42,75	34,25	37,5	29,5	23	23
Deneme10	48,75	58,75	47,5	34,5	42	34,25	30
X	42,23	49,35	38,53	40,88	36,83	25,43	30,68
Sx	2,717	3,59	3,437	2,342	3,576	3,896	3,466

Talp yıkama içindeki gruplar kendi içinde, HOS teste verdikleri yanıtın önemliliği bakımından, karşılaştırıldığında TB ile T arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlenirken ($P>0,05$); TB grubunun TK ve C grubuyla arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0,05$). TK grubunun diğer Talp yıkama grubu ve kontrolle arasındaki fark önemli bulunmuştur($P<0,05$). T grubunun kontrol grubuyla arasındaki fark istatistik açıdan önemli bulunmamıştır($P>0,05$).

Çizelge 3.15. Talp yıkama alt gruplarının çözüm sonu HOS Test oranları ve farkların önemliliği.

	N	Alt Sınır	Üst Sınır	HOST (%)
Grup1 (TB)	10	30	52,5	42,23 ^b ±2,717
Grup2(TK)	10	21,25	58,75	49,35 ^a ±3,59
Grup3(T)	10	28	54,5	38,53 ^{bc} ±3,437
Grup7(C)	10	23	52,25	30,68 ^c ±3,466

a, b, c : Farklı harfler grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğunu belirtir (P<0,05).

Ringer yıkamanın dondurma alt gruplarına bakıldığında, RB grubunun RK ve C gruplarıyla arasında olan fark önemsiz bulunurken (P>0,05); R grubuyla olan fark önemli bulunmuştur (P<0,05). Bu parametre bakımından, RK grubu ile C grubu arasında önemli fark oluşmazken (P>0,05); RK ile R arasında önemli fark olduğu gözlemlenmiştir (P<0,05). R ile C arasındaki fark önemli bulunmamıştır (P>0,05).

Çizelge 3.16. Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu HOS Test oranları ve farkların önemliliği.

	N	Alt Sınır	Üst Sınır	HOST (%)
Grup1 (RB)	10	28,75	51,25	40,88 ^b ±2,342
Grup2(RK)	10	20	48,75	36,83 ^b ±3,576
Grup3(R)	10	12,5	34,25	25,43 ^a ±3,896
Grup7(C)	10	23	52,25	30,68 ^{ab} ±3,466

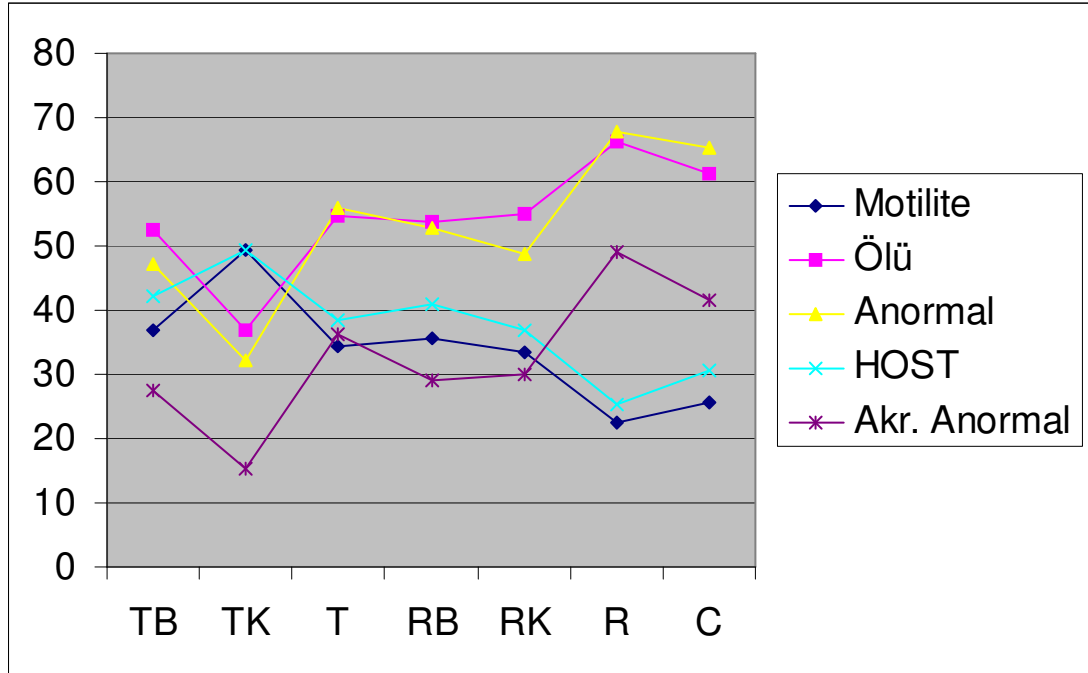
a, b, c : Farklı harfler grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğunu belirtir (P<0,05).

İki yıkama grubunun dondurma alt grupları karşılaştırıldığında, TB ile RB arasında istatistiki açıdan önemli fark gözlemlenmezken (P>0,05); TK ile RK arasında istatistiki fark oluşmuştur (P<0,05). T ile R grubu arasındaki fark istatistiki olarak önem arz etmektedir (P<0,05).

Çizelge 3.17. Talp ve Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu HOS Test oranları farkının önemliliği.

	N	HOST(%)	Kesin önem	P
Grup1(TB)	10	42,23	0,481	>0,05
Grup4(RB)	10	40,88		
Grup2(TK)	10	49,35	0,010	<0,05
Grup5(RK)	10	36,83		
Grup3(T)	10	38,53	0,029	<0,05
Grup6(R)	10	25,43		

Şekil 3.1. Araştırma gruplarında spermatolojik parametrelerin genel görünümü



3.2.5. Akrozoma Bağlı Anormal Spermatozoa Oranı

Akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranına bakıldığında; Grup 1(TB), Grup 2(TK), Grup 3(T), Grup 4(RB), Grup 5(RK), Grup 6(R), Grup 7(Kontrol/C) için sırasıyla: $\%27,60 \pm 2,34$, $\%15,40 \pm 2,33$, $\%36,25 \pm 3,77$, $\%29,20 \pm 2,40$, $\%29,95 \pm 5,23$, $\%48,92 \pm 5,54$, $\%41,62 \pm 4,75$ olarak gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.18. Çözüm sonu Akrozoma Bağlı Anormal Spermatozoa oranları.

Akrozomu Anormal (%)	Grup1 (TB)	Grup2 (TK)	Grup3 (T)	Grup4 (RB)	Grup5 (RK)	Grup6 (R)	Grup7(C) Kontrol
Deneme1	35,5	25,75	22,5	30,25	12,5	63,5	23,5
Deneme2	23,75	21,5	36	25	22,5	42,5	18,75
Deneme3	22,5	10,75	45	31,5	51,75	73,75	55
Deneme4	29	13,5	27	31,75	29,5	25	41,25
Deneme5	43,75	14,75	65	43,75	71,5	75	58,25
Deneme6	21,75	18,25	39,25	22,75	21,5	42,75	58
Deneme7	20	4,25	28,25	16	13,25	28,5	22,5
Deneme8	21,75	12	33,25	25	28,75	50	46,75
Deneme9	29,5	26	33,75	30	28,25	52,5	49,75
Deneme10	28,5	7,25	32,5	36	20	35,75	42,5
<i>X</i>	27,6	15,4	36,25	29,2	29,95	48,925	41,625
<i>Sx</i>	2,349	2,339	3,771	2,409	5,235	5,542	4,754

Talp yıkama içindeki dondurma gruplarına bakıldığında akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranları bakımından TB grubuyla TK ve C grubu arasında oluşan farkın önemli olduğu ($P < 0,05$), T grubuyla arasındaki farkın ise istatistiki açıdan önem göstermediği belirlenmiştir ($P > 0,05$). Bu spermatolojik parametre bakımından TK grubunun diğer talp yıkama alt gruplarıyla oluşturduğu fark istatistiki açıdan önemlilik arz etmektedir ($P < 0,05$). T ile kontrol grubu arasındaki fark önemli değildir ($P > 0,05$).

Çizelge 3.19. Talp yıkama alt gruplarının çözüm sonu Akrozoma Bağlı Anormal Spermatozoa oranları ve farkların önemliliği.

	N	Alt Sınır	Üst Sınır	Akrozoma Bağlı Anormal(%)
Grup1 (TB)	10	20	43,75	27,600 ^b ±2,349
Grup2(TK)	10	4,25	25,75	15,4 ^a ±2,339
Grup3(T)	10	22,5	45	36,25 ^{bc} ±3,771
Grup7(C)	10	18,75	58,25	41,625 ^c ±4,754

a, b, c : Farklı harfler grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğunu belirtir (P<0,05).

Ringer yıkama içinde bulunan dondurma gruplarına bakıldığında ise RB, RK ve C grupları arasındaki fark önemlilik göstermemektedir(P>0,05). RB ile R ve RK ile R arasındaki fark önemlidir(P<0,05). R ile C arasındaki fark ise önemli değildir(P>0,05).

Çizelge 3.20. Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu Akrozoma Bağlı Anormal Spermatozoa oranları ve farkların önemliliği.

	N	Alt Sınır	Üst Sınır	Akrozoma Bağlı Anormal(%)
Grup1 (RB)	10	16	43,75	29,2 ^a ±2,409
Grup2(RK)	10	12,5	71,5	29,95 ^a ±5,235
Grup3(R)	10	25	73,75	48,925 ^b ±5,542
Grup7(C)	10	18,75	58,25	41,625 ^{ab} ±4,754

a, b, c : Farklı harfler grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğunu belirtir (P<0,05).

İki yıkama grubunun alt grupları arasındaki farkın istatistik önemliliği değerlendirildiğinde, TB ile RB arasındaki fark önemli görülmezken(P>0,05); TK ile RK ve T ile R arasındaki fark önemli bulunmuştur(P<0,05).

Çizelge 3.21. Talp ve Ringer yıkama alt gruplarının çözüm sonu anormal akrozom oranları farkının önemliliği.

	N	Akr. Bağ. Ano. (%)	Kesin önem	P
Grup1(TB)	10	27,6	0,280	>0,05
Grup4(RB)	10	29,2		
Grup2(TK)	10	15,4	0,010	<0,05
Grup5(RK)	10	29,95		
Grup3(T)	10	36,25	0,089	>0,05
Grup6(R)	10	48,925		

4.TARTIŞMA

Ankara Tekesi spermasının seminal plazmasından ayrıldıktan sonra boğa veya koç seminal plazması katılmış yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla dondurulmasına ilişkin özgün çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmadan elde edilen istatistik veriler yıkama sonrası dondurulan Ankara Tekesi ve diğer ırklarla ilgili yapılmış çalışmalarla karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada 4 Ankara Tekesinin 10'ar ejakulatında saptanan motil spermatozoa oranı en yüksek % 85 , en düşük % 65 ve ortalama $76 \pm 5,67$ olarak bulunmuştur. Bu değer Ankara tekelerinde Daşkın (1991) % 81, Tekin ve arkadaşlarının (1996) % 81, Daşkın ve Tekin'in (1996) % 83,28, Sevinç ve arkadaşlarının (1985) % 83,49 ve %86,82 olarak belirlediği motilite oranlarından düşük; Dünder ve arkadaşlarının (1983) %77,26 ve %77,67 olarak belirlediği motilite oranlarına yakın ve Muyan' ın (1987) % 68,5 olarak belirlediği motilite oranından yüksektir.

Natif spermanın ölü spermatozoa yüzdesi en yüksek %21,25 , en düşük % 5,25 ortalama $13,1 \pm 4,13$ olarak tespit edilmiştir. Bu oran Muyan'ın (1987) %25,78 olarak tespit ettiği orandan düşük; Daşkın' ın (1991) % 11,6 olarak saptadığı orandan ise kısmen yüksektir.

Anormal spermatozoa oranı ise en yüksek %10,75 en düşük 5,25 ve ortalama da ise $9,875 \pm 3,89$ olarak belirlenmiştir. Bu oran Daşkın'ın (1991) %3,63; Muyan'ın (1987) %5,34; Tekin ve arkadaşlarının (1996) %3,63; Daşkın ve Tekin'in (1996) %4,17; Sevinç ve arkadaşlarının (1985) %2,06; Dünder ve arkadaşlarının (1983) %4,86 olarak tespit ettikleri oranlardan yüksek olduğu belirlenmiştir. Akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranı ise en yüksek % 2,5 en düşük %0 ve ortalama da ise $0,9 \pm 0,8$ olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada natif spermada belirlenen Anormal akrozom oranı Muyan'ın (1987) 0,09 ve 0,27 arasında belirlediği ortalama oranlardan daha yüksektir.

Hipoosmotik şişme testine yanıt yüzdesi en yüksek %76,25 en düşük % 65 ve ortalama olarak $70,875 \pm 3,05$ olarak saptanmıştır. Ankara tekesiyle ilgili başka bir çalışmaya rastlanmadığından karşılaştırılamamıştır.

Karışım natif spermanın yoğunluğu en yüksek 4,2 milyar/ml, en düşük 2,2 milyar/ml ortalama ise $3,03 \pm 0,61$ milyar/ml olarak bulunmuştur. Bu yoğunluk değeri Daşkın' ın (1991) ve Tekin ve arkadaşlarının (1996) 2,892 milyar/ml; Ritar ve arkadaşlarının (1992) 2,43 milyar/ml; Daşkın ve Tekin'in (1996) 2,386 milyar/ml olarak tayin ettiği değerden yüksek; Muyan'ın (1987) 3,692 milyar/ml; Dünder ve arkadaşlarının (1983) 3,31 milyar/ml olarak tayin ettiği değerden düşük; Sevinç ve arkadaşlarının 3,11 milyar/ml olarak tayin ettikleri değere yakın ancak düşüktür. Mendoza ve arkadaşlarının (1989) Nisan ayında elde ettikleri değerden (3,33 milyar/ml) düşük Temmuz (2,94 milyar/ml) ayında elde ettikleri değere ise yakın olduğu görülmektedir.

Dört Ankara tekesinden alınarak birleştirilen spermanın toplam miktarı en yüksek 5 ml en düşük 3 ml olarak belirlenmiştir. Ortalama karışım sperma miktarı $3,95 \pm 0,52$ ml olmuştur. Teke başına düşen ortalama sperma miktarı ise yaklaşık $0,9875 \pm 0,13$ ml olmuştur. Bu çalışmada elde edilen sperma miktarının Daşkın'ın (1991) 0,9 ml; Tekin ve arkadaşlarının (1996) 0,9 ml; Ritar ve arkadaşlarının (1992) 0,7 ml; Mendoza ve arkadaşlarının (1989) 0,8 ml (Nisan ayında); Dünder ve arkadaşlarının (1983) 0,94 ml olarak elde ettikleri ortalama sperma miktarlarından yüksek, Sevinç ve arkadaşlarının (1985) 1,07 ml; Muyan'ın(1) 1,131 ml; Daşkın ve Tekin'in (1996) 1,44 ml olarak elde ettikleri ortalama sperma miktarlarından düşük olduğu görülmektedir. Elde edilen sperma miktarı Mendoza ve arkadaşlarının (1989) Temmuz ayında elde ettikleri 0,98 ml değerine ise yakındır.

Bu araştırmada elde edilen natif spermanın spermatolojik değerlerine ilişkin bulgular ile diğer araştırmacıların bildirdiği veriler arasında görülen farklar, araştırmada kullanılan tekelerin genotiplerine, yaşlarına, sayılarına, sperma alma aralığı, ve zamanına bağlı olabileceği gibi bakım-besleme ve çevre koşullarının farklılıklarından da kaynaklanmış olabilir.

Diğer taraftan sperma alma ve değerlendirmede kullanılan yöntemlerin farklılığı da elde edilen verilerin farklı olmasında etkili olmuş olabilir.

Araştırmada, 4 Ankara Tekesinden peş peşe alınan 4 ejakulat birleştirilerek karışım sperma elde edilmiştir. Karışım sperma gereç ve yöntemde de belirtildiği gibi Talp veya Ringer solüsyonları kullanılarak yıkama işleminden geçirilerek seminal plazmasından ayrılmıştır. İki farklı solüsyon kullanılarak seminal plazmasından ayrılmış Ankara Tekesi sperması koç, boğa seminal plazması içeren veya seminal plazma içermeyen Tris Yumurta Sarısı Gliserol sulandırıcısıyla her payette 50 milyon spermatozoon olacak şekilde sulandırılmış ve equilibrasyon (alışım) işleminden sonra belirtilen şekilde dondurulmuş ve sıvı azot içinde saklanmıştır. Böylelikle 6 farklı çalışma grubu oluşturulmuştur. Her hangi bir yıkama işleminden geçmemiş yani seminal plazması ayrılmadan; boğa veya koç seminal plazması içermeyen Tris Yumurta Sarısı Gliserol solüsyonuyla her payette 50 milyon spermatozoon olacak şekilde sulandırılıp equilibrasyon işleminden geçirildikten sonra dondurulmuş Ankara Tekesi sperması kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Böylelikle kontrol grubunun da dahil edilmesiyle çalışmada 7 deneme grubu oluşmuştur.

Çözüm sonu spermatolojik parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla 7 çalışma grubuna ait payetler 40°C'lik su banyosunda 20 saniyede çözülerek, her gruba ait Motilite(%), Ölü spermatozoa (%), Anormal spermatozoa (%), HOS test (%) ve Akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranları (%) tayin edilmiştir.

Çözüm sonu, 10 denemeden elde edilen ortalama motil spermatozoa oranları 1. Grup (TB), 2. Grup (TK), 3. Grup (T), 4. Grup (RB), 5. Grup (RK), 6. Grup (R) ve 7. Grup (C- Kontrol) için sırasıyla %37, %49,5, %34,5, % 35,5, %33,5, %22,5 ve %25,5 olarak belirlenmiştir. Bu veriler Daşkın ve Tekinin (1996) Ankara Tekesi spermasını seminal plazmasından ayırmaksızın Tris Yumurta sarısı Gliserol solüsyonuyla sulandırarak dondurdukları çalışmadan elde ettikleri %47,4'lük motilite oranı ile karşılaştırıldığında; 2. Grup (TK- Talp solüsyonuyla yıkanarak seminal plazmasından

ayrılmış ve koç seminal plazması içeren Tris Yumurta Sarısı Gliserol solüsyonuyla sulandırılarak dondurulmuş Ankara tekesi sperması) hariç tüm diğer grupların motil spermatozoa oranları bu çalışmada elde edilen yüzdenin altında kalmaktadır. Bu çalışmadaki tüm gruplarda elde edilen motil spermatozoa oranları, Daşkın ve Tekinin (1996) yumurta sarısı içermeyen Tris Gliserol solüsyonu kullanarak elde ettikleri çözüm sonu %19,1 motil spermatozoa oranının ise üzerindedir. Daşkın (1991) seminal plazmayı ayırmaksızın çözüm sonu % 40,1 olarak belirlediği motil spermatozoa oranından ise 2. Grup hariç düşüktür.

Bu araştırmada elde edilen ortalama motil spermatozoa oranları, Cabrera ve arkadaşlarının (2005) Kanarya Tekelerinde yıkama işlemi uygulandıktan sonra %12 oranında yumurta sarısı içeren Tris Gliserol solüsyonuyla sulandırılarak dondurulmuş spermada elde edilen %30,1 lik motil spermatozoa oranından 6. Grup (R) ve 7. Grup (C) hariç yüksek bulunmuştur. 6. ve 7. Grupta elde edilen motil spermatozoa oranları yıkama işlemi yapılmaksızın %12 yumurta sarısı içeren sulandırıcıyla dondurulan Kanarya tekesi spermasının motil spermatozoa oranına (%22,1) yakınlık göstermektedir.

Jimenez ve arkadaşlarının (2006) Murciano ırkı tekelerde yaptıkları çalışmada yıkama işleminden sonra dondurdukları spermada çözüm sonu %30 motil spermatozoa oranı elde etmişlerdir. Talp veya Ringer solüsyonuyla yıkama işlemi uygulandıktan sonra dondurulan Ankara Tekesi spermasıyla karşılaştırıldığında; 3. Grup (T) ta elde edilen %34,5 motilite Jimenez ve arkadaşlarının oranının üzerinde olurken, 6. Grup (R) ta elde edilen % 22,5 motilite oranı Jimenez ve arkadaşlarının belirledikleri oranın altında kalmaktadır.

Aboagla ve Terada'nın (2004) dondurmada kullanılan Tris Gliserol sulandırıcısına %20 yumurta sarısının katımının etkisi üzerine yapmış oldukları çalışmada CASA (bilgisayar yardımlı sperm analiz) yardımıyla progresiv motilitenin yumurta sarısı içermeyen grupta %1; %20 yumurta sarısı içeren grupta ise %46 olduğunu belirlemişlerdir. Bu motilite oranı bu çalışmadaki 2. Grup (TK) hariç tüm gruplardan yüksektir.

Saanen tekelerinde yapılan bir çalışmada ise seminal plazma ayrılmaksızın veya ayrılarak yapılan dondurma işlemlerinde çözüm sonu motilite oranları sırasıyla %28,33 ve %18,64 olarak saptanmıştır. Seminal plazması ayrılmamış grubun motilite değerleri çalışmadaki 6. ve 7. Gruplar hariç tüm grupların altında kalırken; seminal plazması ayrılarak dondurulmuş grubun motilite değeri çalışmada bulunan tüm grupların motilite değerleri altında kalmıştır.

Çözüm sonu motil spermatozoa oranlarında gözlenen farklılıklar, seminal plazmanın ayrılıp ayrılmamasına, dondurma işleminde kullanılan sulandırıcı ve tekniklerdeki farklılıklara, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere, analizi yapan kişi veya cihaza bağlı olarak meydana gelmiş olabilir. Ayrıca ırksal, mevsimsel ve bireysel farklılıklar da motilite oranlarında farklılığa neden olmuş olabilir.

Bu çalışmada çözüm sonu elde edilen ölü spermatozoa oranı 1. Grup (TB), 2. Grup (TK), 3. Grup (T), 4. Grup (RB), 5. Grup (RK), 6. Grup (R) ve 7. Grup (C) için sırasıyla %52,6, %36,9, %54,65, %53,875, % 55, %66,32 ve %61,15 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, 6. Grup hariç, Jimenez ve arkadaşlarının (2006) Murciana ırkı keçilerde yapmış olduğu çalışmada tespit ettiği %65,7 çözüm sonu ölü spermatozoa oranından daha düşüktür. Kanarya ırkı tekelerde yapılan çalışmada ise çözüm sonu ölü spermatozoa oranı yıkanmış spermada % 69,6; yıkanmamış spermada ise %72 olarak bulunmuştur (Cabrera ve ark., 2005). Çalışmada çözüm sonu elde edilen ölü spermatozoa oranları bu değerlerin altında kalmaktadır. Choe ve arkadaşlarının (2006) Kore'nin yerli keçilerinde yaptıkları çalışmada, çözüm sonu ölü spermatozoa yüzdesi seminal plazması ayrılmamış (bütün) spermada % 97 olurken, seminal plazması ayrılmış (yıkanmış) spermada % 44 olmuştur. Seminal plazması ayrılmamış spermanın çözüm sonu ölü spermatozoa oranı bu çalışmada bulunan tüm grupların ölü spermatozoa oranının çok üzerinde yer alırken; yıkanmış spermanın çözüm sonu ölü spermatozoa değeri, araştırmada yer alan 2. Grup (TK) hariç tüm grupların altında yer almıştır.

Çalışmada çözüm sonu gruplarda elde edilen ölü spermatozoa oranlarıyla diğer araştırmacıların elde ettiği çözüm sonu ölü spermatozoa oranları arasındaki farklılıklar teke ırklarının farklılığından, sperma sulandırıcısının içeriğinden, seminal plazmanın ayrılıp ayrılmamasından, sulandırma oranından, dondurma tekniğindeki farklılıklardan ve çözüm sıcaklığı ile süresinden kaynaklanıyor olabilir.

Bu çalışmada çözüm sonu anormal spermatozoa oranı 1. Grup (TB), 2. Grup (TK), 3. Grup (T), 4. Grup (RB), 5. Grup (RK), 6. Grup (R) ve 7. Grup (C) için sırasıyla % 47,12, %31,3, %55,82 , %52,82 , %48,6, %67,85 ve %65,35 olarak tespit edilmiştir.

Araştırmada HOS Test sonucunda kuyruğu kıvrılan spermatozoonların oranları 1. Grup (TB), 2. Grup (TK), 3. Grup (T), 4. Grup (RB), 5. Grup (RK), 6. Grup (R) ve 7. Grup (C) için sırasıyla %42,23, %49,35, %38,53, %40,88, %36,83, %25,43 ve %30,68 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada çözüm sonu anormal akrozom oranları 1. Grup (TB), 2. Grup (TK), 3. Grup (T), 4. Grup (RB), 5. Grup (RK), 6. Grup (R) ve 7. Grup (C) için sırasıyla % 27,6, %15,4, %36,25,%29,2, %29,95, %48,92 ve %41,62 olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen çözüm sonu anormal akrozom oranları, Daşkın (1991) seminal plazması ayrılmadan %20 yumurta sarısı içeren Tris sulandırıcısıyla sulandırarak dondurduğu Ankara tekesi spermasında çözüm sonu elde ettiği %23,36'lık değer, 2. Grup (TK) hariç, üzerinde bulunmuştur. Daşkın ve Tekin'in (1996) Ankara tekesi spermasının, yumurta sarısı içeren ve içermeyen, Tris-gliserin sulandırıcılarıyla dondurulması üzerine yaptığı çalışmada elde ettiği % 24,94 ve %32,97 anormal akrozoma sahip spermatozoon oranıyla karşılaştırıldığında; araştırmadaki gruplarda elde edilen değerler yumurta sarısının kullanıldığı grubun değerinin (%24,94), 2. Grup (TK) (%15,4) hariç, üzerinde kalmıştır. Yumurta sarısı içermeyen grupla (%32,97) karşılaştırıldığında 1.Grup(TB) , 2.Grup(TK), 4.Grup(RB) ve 5.Grup (RK) anormal akrozom oranları bakımından bu değer altında; 3. Grup (T), 6. Grup (R) ve 7. Grup (C) bu değer üzerinde yer almıştır.

Bu çalışmada elde edilen çözüm sonu anormal akrozom oranları diğer ırklarda yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında; Cabrera ve arkadaşlarının (2005) Kanarya tekelerinde yaptığı çalışmada yıkanmış spermanın %12 yumurta sarısı içeren Tris sulandırıcısıyla çözüm sonu elde ettiği %62 ve yıkanmamış spermayla elde ettiği %55,6'lık değerlerin altında kalmıştır.

Bu araştırmada elde edilen anormal akrozom oranıyla diğer çalışmalarda elde edilen akrozom oranları arasındaki farklılıklar tekelerin genotipik ve ırksal farklılıklarından, sperma sulandırıcısının içeriğinden, sulandırıcıda kullanılan yumurta sarısının oranından, seminal plazmanın ayrılıp ayrılmamasından, sulandırıcılara seminal plazma katılıp katılmamasından, dondurma ve çözüm prosedürleriyle değerlendirmede kullanılan teknikler arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Bu çalışmada elde edilen verilere genel olarak bakıldığında bir çok araştırmacıyı (Leboeuf ve ark., 2000 ;Amoah ve Gelaye, 2004;Holtz, 2005 ;Islam ve ark., 2005; Purdy, 2005) doğrular şekilde; teke spermasının yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla sulandırmadan önce yıkanmasının dondurma çözündürme sonrası spermatolojik parametreleri olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Teke seminal plazmasının ayrılmasının olumlu etkisi, Pelicer'in (1996) ortaya koyduğu gibi BUSgp60 enziminin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla ilgili olabilir. Böylelikle bu enzimin yumurta sarısı içinde bulunan ve spermanın soğuktan ve donmadan korunmasında önemli rol alan lesitin ve lipoproteinlerle etkileşerek zararlı bileşiklerin ortaya çıkması engelleniyor olabilir.

Teke seminal plazmasının ayrılmasında kullanılan solüsyonun önemi bu çalışmada ortaya konmuştur. Bazı kaynaklarda belirtildiği gibi (Leboeuf ve ark., 2000) her hangi bir izotonik solüsyonun bu işlem için kullanılması uygun olmayabilir. Bu çalışmada, özellikle Sperm-Talp ile yapılan yıkamalardan olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni Talp solüsyonun daha kompleks içeriğe sahip olması olabilir. Ayrıca bir tampon olan Heps'in varlığı özellikle etkili olmuş olabilir. Böylelikle Talp ile yapılan yıkama işleminde pH değerleri korunmuş olabilir.

Ringer ve Talp arasındaki en önemli farklardan biriside Ringer solüsyonun glikoz içermesidir. Bu bağlamda Ringer solüsyonunda bulunan glikoz teke spermatozoonlarını yıkama işlemleri sırasında aktive ediyor olabilir. Bu aktivasyonda spermatozoonların donma esnasında daha fazla zarar görmesine neden oluyor olabilir.

Yumurta sarısı içeren Tris-gliserol solüsyonuna %5 oranında boğa ve koç seminal plazmasının eklenmesi çözüm sonu spermatolojik parametreleri olumlu etkilemiştir. Bunun nedeni seminal plazma içinde bulunan ve spermatozoonların canlılıklarını korumasını sağlayan bileşiklerden kaynaklanıyor olabilir. Özellikle seminal plazma içinde bulunan ve spermatozoonların membran stabilizasyonunu sağlayan proteinler (BSP, RSP gibi Manjunath ve Therien (2002)) membran yapısının korunmasında önemli rol oynamış olabilirler. Ayrıca Talp solüsyonu kullanılarak seminal plazmasından ayrılmış teke spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcıya koç seminal plazmasının katılması, boğa seminal plazmasına göre daha başarılı olmuştur. Bunun nedeni koç ve teke arasındaki genetik yakınlıkla ilişkili olabileceği gibi koç seminal plazmasında yüksek oranda bulunan gliseril fosforil koline de bağlanabilir. Daha öncede belirtildiği gibi *gliseril fosforil kolin* fosfataz enzimi tarafından gliseril ve koline parçalanmaktadır. Bu iki bileşik hücre tarafından enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Ayrıca gliseril ve kolin spermatozoon membranına bağlanarak membran stabilizasyonunda rol oynamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmadan elde edilen bulgular doğrultusunda, 4 Ankara (Tiftik) tekesinden bir biri ardı elde edilen spermaların birleştirilmesiyle oluşturulan karışım spermanın ortalama sperma miktarı, motilite oranı, ölü spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranı, HOS test oranı, anormal akrozom oranı ve yoğunluğu sırasıyla $3,95 \pm 0,52$ ml, $\%76 \pm 5,67$, $\%13,1 \pm 4,13$, $\% 9,87 \pm 3,89$, $\% 70,87 \pm 3,05$, $\% 0,9 \pm 0,84$ ve $3,03 \pm 0,61$ milyar/ml olarak belirlenmiştir. Ankara tekesinin spermatolojik parametreleri üzerine sağlanan bu bulgular bir çok literatür bulgularıyla bir birini destekler niteliktedir. Oluşan farklılıklar, araştırmalarda kullanılan tekelerin genotipik farklılıklarına, yaşlarına, sayılarına, sperma alma aralığına, sıklığına ve zamanına bağlı olabileceği gibi bakım ve besleme gibi çevresel koşullardan da kaynaklanıyor olabilir.

Ankara tekesi spermasının, yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla dondurma öncesi, seminal plazmasından ayrılmasının gerekliliğini (1), bu ayırma işleminde kullanılacak yıkama solüsyonlarının önemini (2) ve dondurmada kullanılacak sulandırıcıya, teke seminal plazmasında bulunan yararlı bileşikleri kompanze edecek şekilde, belirli oranlarda boğa veya koç seminal plazmasının katımının etkisini (3) sorgulamak için oluşturulan 7 farklı çalışma grubunun çözüm sonu spermatolojik parametrelerine bakılmıştır.

Genel değerlendirme sonucunda yıkama işlemi yapılan gruplar çözüm sonu spermatolojik parametreler yönünden kontrol grubuna üstünlük sağlamıştır. Bu bulgulara ek olarak, Talp ile yıkama işleminden geçirilerek seminal plazmadan ayrılmış teke spermasının, Ringer ile yıkanarak seminal plazasından ayrılmış aynı orjinli spermaya üstünlük sağladığı görülmüştür. Bu üstünlük özellikle boğa veya koç seminal plazması katılmamış yumurta sarılı sulandırıcılarla dondurulmuş spermada daha açık şekilde ortaya çıkmıştır.

Yıkanmış Ankara Tekesi spermasının dondurulmasında kullanılacak sulandırıcılara belli oranda boğa veya koç seminal plazmasının katılmasının çözüm sonu spermatolojik parametreleri olumlu etkilediği görülmektedir. Bulgular doğrultusunda özellikle ringer gibi buffer içermeyen solüsyonların yıkama işleminde kullanılmasında bu etki daha açık ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda; Ankara tekesi spermasının , yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla dondurulması öncesi, yıkama işleminden geçirilerek seminal plazmasından ayrılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca yıkama işleminde Sperm-Talp gibi buffer solüsyonların kullanılmasının uygun olacağı sonucuna da ulaşılmıştır. Yıkanmış Ankara tekesi spermasının, boğa veya koç seminal plazması içeren sulandırıcılarla sulandırılması da dondurmanın başarısını olumlu yönde etkileyecektir.

Yukarıda belirtilen sonuçlar doğrultusunda araştırma amacına ulaşmıştır. Ancak elde edilen sonuçların nedenlerinin tam olarak ortaya konulması ileri düzey çalışmaları gerektirmektedir.

ÖZET

Yıkanmış Ankara Tekesi Spermasının Boğa ve Koç Seminal Plazması Eklenmiş Sulandırıcıyla Dondurulması

Bu çalışmanın amacı Ankara tekesi spermasının dondurma öncesi yıkanarak seminal plazmasından ayrılmasının, yıkamada kullanılan farklı solüsyonların ve seminal plazmasından ayrılmış Ankara tekesi spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcılara belirli oranda (%5) boğa veya koç seminal plazmasının eklenmesinin çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkisini araştırmaktır.

Çalışmada 4 adet Ankara tekesi kullanılmıştır. Sperma 4 Ankara tekesinden her birinden 10'ar ejakulat olmak üzere haftada iki kez suni vagen kullanılarak alınmıştır. Alınan spermalar birleştirildikten sonra, yaklaşık 1/7'si alınarak Tris Yumurta sarısı (%20) Gliserol (%7) sulandırıcısıyla her payette 50 milyon spermatozoon olacak şekilde sulandırılmış ve equilibrasyon işlemini (+4°C'de 2 saat) takiben sıvı azot buharında (-110/-130°C arasında 15 dakika) dondurularak; sıvı azot içinde (-196°C) saklanılmıştır. Geriye kalan sperma iki eşit kısma ayrılarak; her bir eşit hacim 1:10 Sperm-TALP ve 1:10 Ringer solüsyonuyla süspanse edilerek her yıkama grubu 3 eşit hacimde olacak şekilde santrifüj tüplerine pay edilmiştir. Santrifüj işlemi 600 g'de 15 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işleminden sonra 6 santrifüj tüpünde bulunan pelet süpernatant birleşiminin süpernatant kısmı atılarak dipteki pelet kısmı sulandırma işleminde kullanılmıştır. Her Sperm-Talp ve Ringer yıkama grubundaki seminal plazmasından ayrılmış Ankara tekesi sperması %5 Boğa seminal plazması, %5 Koç seminal plazması veya seminal plazma içermeyen Tris Yumurta sarısı Gliserol solüsyonuyla her payette yaklaşık 50 milyon spermatozoon olacak şekilde sulandırılmıştır. Toplam 6 gruba ait payetler equilibrasyon işleminin ardından, sıvı azot buharında dondurulmuş ve sıvı azot içinde saklanmıştır. Böylelikle birisi kontrol olmak üzere 7 çalışma grubu oluşturulmuştur. Her gruptan payetler 40°C'lik su banyosunda 20 saniye çözülmüş ve alınan örnekler motilite (%), ölü spermatozoon (%), anormal spermatozoon (%), anormal akrozom (%) ve HOS test(%) yönünden değerlendirilmiştir.

Bu araştırmanın sonucunda Grup 3 (T), Grup 6 (R) ve Grup 7 (C)'nin çözüm sonu spermatolojik parametrelerinin karşılaştırılmasıyla, Ankara tekesi spermasının yumurta sarısı kullanılan sulandırıcılarla sulandırılması öncesinde yıkanması gerektiği ve Sperm Talp solüsyonunun Ringer solüsyonuna üstünlük sağladığı görülmüştür (p<0,05).

Ayrıca yıkanmış Ankara Tekesi spermasının dondurulmasında kullanılan Tris Yumurta sarısı Gliserol solüsyonuna belirli oranlarda boğa veya koç seminal plazmasının katımının çözüm sonu spermatolojik parametreleri olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir. Boğa ve koç seminal plazmasının olumlu etkisi Sperm-Talp ile yıkama işlemi yapılmış ve koç seminal plazması katılmış 2. Grupta (TK) daha açık şekilde ortaya çıkarken; Ringer ile yıkama yapılmış grupta boğa ve ya koç seminal plazması katılmış 4. Grupta (RB) ve 5. Grupta (RK) gözlemlenmiştir(p<0,05).

Bu çalışmada, Ankara Tekesi spermasının dondurma öncesi yıkanarak seminal plazmasının ayrılması gerektiği; yıkama işleminde Sperm-Talp solüsyonunun Ringer Solüsyonuna tercih edilmesi gerektiği ve yıkama işlemini takiben spermanın dondurulmasında kullanılan Tris Yumurta Sarısı Gliserol sulandırıcısına boğa veya koç seminal plazmasının eklenmesinin çözüm sonu spermatolojik parametreleri olumlu yönde etkilediği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Ankara Keçisi, sperma, seminal plazma, yıkama, spermanın dondurulması

SUMMARY

Freezing of Washed Angora Goat Semen with Extenders Added Bull and Ram Seminal Plasma

The aim of this study was to investigate the effect of separation of seminal plasma of Angora buck semen by means of washing before cryopreservation, using different solutions in sperm washing and adding of bovine or ovine seminal plasma to extender used for cryopreservation on spermatologic parameters after thawing.

In this study, 4 Angora goats were used. Sperm was collected using artificial vagina twice a week so as to maintain 10 ejaculates from each animal. After harvest of collected sperm, 1/7 portion of total mixed sperm was extended with Tris Egg yolk (%20) Glycerol (%7) to a final concentration of 50 million spermatozoa in each straw. Extended sperm in straws was equilibrated (2 hours at +4°C) and frozen in vapor of liquid nitrogen (LN) (15 minutes at -110/-130°C) and stored in LN. Rest of mixed buck sperm was divided in two equal volumes. Each of equal volumes was suspended with Sperm TALP (1:10) or Ringer (1:10) solutions. Each suspended sperm was allocated into 3 centrifuge tubes. Centrifuge was conducted for 15 minute at 600 g. After centrifuge, supernatants were discarded from 6 tubes and pellets in the bottom of tubes were used in process of extending. Angora buck sperms that had been separated from seminal plasma by means of Sperm TALP or Ringer washing were extended with Tris Egg yolk Glycerol extender including 5 % bovine seminal plasma, 5 % ovine seminal plasma or no seminal plasma so as to sustain 50 million spermatozoa per straw. After equilibration, straws relating to 6 groups were cryopreserved and stored until examination time. In this way, 7 study groups, one of which was control, were composed. Straws from 7 groups were thawed at 40°C for 20 seconds in a benmarie. Motility (%), died spermatozoa (%), abnormal spermatozoa (%), abnormal acrosome(%), HOS Test (%) were evaluated in sperm samples.

In this study, result of comparisons of spermatological parameters of Group 3 (T), Group 6 (R) and Group 7 (C) is that Angora buck semen should be washed before extending with extender containing egg yolk, and Sperm TALP is superior to Ringer solution ($p<0,05$).

In addition, it was determined that adding of bovine or ovine seminal plasma to extender used for cryopreservation of washed Angora buck semen improved spermatological parameters after thawing. The positive impact of bovine and ovine seminal plasma was clearly appeared in 2. Group (TK), which was washed with Sperm TALP and extended with extender containing ovine seminal plasma, compared with control and 3. Group(T)($p<0,05$). This positive effect was also appeared in 4. Group (RB), which was washed with Ringer and extended with extender containing bovine seminal plasma, and 5. Group (RK), which was washed with Ringer and extended with extender containing ovine seminal plasma, compared with control (7. Group-C) and 6 Group(R) ($p<0,05$).

In this study, it is concluded that Angora Goat semen should be washed before cryopreservation especially using extender containing egg yolk, Sperm TALP should be preferred to Ringer solution in washing process and adding of bovine or ovine seminal plasma to extenders following washing process improves spermatologic parameters in frozen-thawed Angora goat semen.

Key Words: Angora goat, semen, seminal plasma, washing, freezing of sperma

KAYNAKLAR

- ABOAGLA, E.M.E., TERADA, T. (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* **62**: 1160-1172.
- AKUSU, M.O., AGIANG, E.A., EGBUNIKE, G.N. (1984). Ejaculate and plasma characteristics of west African Dwarf (WAD) buck. In: *10th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Illinois* **vol. 2**, Abstract No. 50.
- AMOA, E.A., GELAYE, S. (1997). Biotechnological advances in goat reproduction. *J. Anim. Sci.* **75**: 578-585.
- ANDERSEN, K. (1969). Insemination with frozen semen in Goats, In: *European Ass. Animal Prod. Meeting, Helsinki* **vol. 2**: 23-26.
- AVDI M., LEBOUF B., M., TERQUI (2004). Advanced breeding and 'buck effect' in indigenous Greek goat. *Livestock Production Science* **87**: 251-257.
- AZEREDO, G.A., ESPER, C.R., RESENDE, K.T. (2001). Evaluation of plasma integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rum. Res.* **41**: 257-263.
- BARKER, C.A. (1957). Some aspects of artificial insemination in swine and goats. In: Proc. 10th Ann. Conv. National Assoc. Artif. Breeders, Toronto, pp. 127-132.
- BLOM, E. (1962). Male reproductive organs of farm mammals. In: *Reproduction in Farm Animals*. Ed.: E.S.E Hafez.: p.56.
- BOUE, P., CORTEEL, J.M. (1992). Aptitude of male goat sperm to withstand freezing: combined effects of season and time of sexual rest between two successive semen collections. In: Lokeshar, R.R. (ED.), *Recent Advances in Goat Productions. Proc. 5th Int. Conf. on Goats*, New-Delhi **vol. 2**, pp. 1042-1045.
- CABRERA, F., GONZALEZ, F., BATISTA, M., CALERO, P., MEDRANO, A., GRACIA, A. (2005). The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of Canary buck (*Capra hircus*). *Reprod. Dom. Anim.* **40**: 191-195
- CHEMINEAU, P.N., COGNIE (1991). Training manual on artificial insemination in sheep and goat, *FAO*, Rome, Italy.
- CHOE, C.Y., KIM, J.G., CHO, S.R., SON, D.S., KIM, Y.K., BALASUBRAMANIAN, S., CHOE, S.Y., RHO, G.J. (2006). Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korea native bucks. *Reprod. Dom. Anim.* **41**: 55-60.

CORTEEL, J.M. (1977). Production, storage and artificial insemination of goat semen. In: *Managemnent of Reproduction in Sheep and Goats Symposium*, Madison, July 24-25, pp. 41-57.

CORTEEL, J.M. (1981). Collection, proceeding and artificial insemination of goat semen. In: Gall, C. (Editör), *Goat Production*. Academic Press, London, pp. 171-191.

CORTEEL, J.M., BARIL, G., LEBOEUF, B. (1980). Residual seasonal variations in fertility in selected deep-frozen ejaculates of European dairy male gats. In: *9th Int. Congr. Anim. Reprod.* A.I. Madrid **vol. 5**, pp. 422-425.

CORTEEL, J.M., BARIL, G., LEBOEUF, B. (1987). Development and application of artificial insemination with deep frozen semne and out of season breeding of goats in France. In: *Proc. 4th Int. Conf. Goats. Brasilia* **vol. 1**, pp. 523-547.

COURTENS, J. L., NUNES, J., CORTEEL, J.M. (1984). Introduction of the acrosome reaction in the spermatozoa of goat by secretions of the male accessory glands and milk. *Gam. Res.* **9**: 287-302.

DAS, K.K., RAJKONWAR, C.K. (1995). Effects on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. *Int. J. Anim. Sci.* **10**: 127-128.

DASKIN, A. (1991). Teke spermasının dondurulması ve değişik yöntemlerle östrusları sinkronize edilen Ankara Keçileinin tohumlamalarından elde edilen dölverimi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DASKIN, A., TEKIN, N. (1996). The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora Buck semen. *Tr. J. of Veterinary and Animal Science*, **20**: 395-398.

DEKA, B.C., RAO, A.R. (1987). Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semne. *Indian Vet. J.*, **64**: 591-594.

DELGADILLO, J.A., LEBOEUF, B., CHEMINEAU, P. (1992). Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by short photoperiodic cycles in he-goats. *Small Ruminant Res.*, **9**: 47-59.

DELGADILLO, J.A., LEBOEUF, B., CHEMINEAU, P., (1993). Maintenance of sperm production in bucks during third year of short photoperiodic cycles. *Reprod. Nutr. Dev.*, **33**: 609-617.

DELGADILLO J. A., CANEDO G. A., CHEMINEAU P., GUILLOUME, MALPAUX (1999). Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male creole goats in subtropical Northern Mexico. *Theriogenology*, **52**: 727-737.

DUNDAR, Y., TEKIN, N., ALTINTAS, A.(1983). Ankara Keçisi spermasında, früktoz ve früktoz ile sperma plazmasında bazı kimyasal maddeler yönünden araştırma. *Lal. Hay. Araş. Ens. Der.*, **XXIII(3-4)**: 100-113.

ELWISHY, A.B., ELSAWAF, S.A. (1971). Development of sexual activity in male Damascus goats. *Indian J. Anim. Sci.*, **5**: 350-355.

EPPLESTON, J., POMARES, C.C., STOJANOV, T., MAXWELL, W.M.C. (1994). In vitro fertility of liquid stored goat spermatozoa. *Proc. Aust. Soc. Rep. Biol.*, **26**: 111-118.

HANCOCK, L.J. (1952). The Morphology of bull spermatozoa. *J. Exp. Biol.*, **29**: 445-453.

HOFFMAN, B., LEIDL, W., KARG, H. (1972). Seasonal rhythm of reproduction in the male goat. In: *Proc. 7th Int. Cong. Anim. Reprod. A.I., Munich*, **vol. 3**: 2065-2068.

HOLTZ, W. (2005). Recent developments in assisted reproduction in goats. *Small Rum. Res.*, **60**: 95-110.

ILERI K., AK K., PABUCCUOGLU S., BIRLER S. (1996). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. İstanbul. p.: 29,66-67.

IRITANI, A, NISHIKAWA, Y. (1963). Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen: IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. Japan. *J. Anim. Repro.* **8 (4)**: 113-117.

IRITANI, A, NISHIKAWA, Y., RUKUHARA, R. (1961). Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat sperm: I. Localization of coagulating factors and decline of pH following coagulating. In: *Proc. Silver Jubilee Lab. Anim. Husbandry, Kyoto University*, p.: 89-96.

ISLAM, R., AHMED, K., DEKA, B.C. (2006). Effect of holding and washing on the quality of goat semen. *Small Rum. Anim Sci.* **66**: 51-57.

JIMENEZ, F.M., CASTRO, M.P.V., BALASCH, S., MOCE, E., SILVESTRE, M.A., GOMEZ, E.A., VICENTE, J.S. (2006). Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*. **52**: 295-304.

KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., KARATZAS, G. (2000). Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen, Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, **53**: 1285-1293.

LALL, H.K. (1947). Some common breeds of goats in India. III. *Indian Farming*, **8**: 322-327.

LEBOEUF, B., RESTALL, B., SALOMON, S., (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, **62**, 113-141.

LEBOEUF, B., LE VERN, Y., FURSTOSS V., KERBOEUF, D., GUILLOUET, P., MAGISTRINI, M. (2006). Response of goat sperm to hypoosmotic steps modelled probit analysis. *Anim. Rep. Sci.* 91: 265-274.

MANJUNATH, P., THERIEN, I. (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Repro. Immun.* **53**: 109-119.

MANN, T., LUTWAK-MANN, C. (1981). Male reproductive function and the composition of semen: General Considerations. Page: 27-38 In: Male Reproductive Function and Semen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg press in New York.

MAXWELL, W.M.C., SALAMON, S. (1993). Liquid storage semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* **5**: 613-638.

MENDOZA, G., WHITE, I.G., CHOW, P. (1989). Studies of chemical components of Angora Goat seminal plasma. *Theriogenology*. **September, 32,3**: 455-466

MUKHERFEE, D.P. (1992). Changes in the semen characteristics of Kambing x Kathan crossbreed buck under hot and humid environmental temperatures. In: Lokeshan, R.R. (editor), Recent advances in goat production. Proc. 5th Int. Cont. Goats, New Delhi, p.: 1126-1129.

MUYAN, M. (1987). Ankara Keçilerinde spermatolojik özellikler ve dölverimi. Doktora Tezi. Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

NISHIKAWA, Y., TORIGAI, Y., TACHIKAWA, M., WAIDE, Y. (1961). Experiments on conception with spermatozoa preserved with ncospmnan prepared exclusively for goat usc. In: *Proc. Silver Jubilee Lab. Anim. Husbandry, Kyoto University*, pp. 67-73.

ORGEUR, P., MINMOUNI, P., SIGNORET, J.P. (1990). The influence of rearing conditions on the social relationship of young male goats (*Capra hircus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* **27**, 105-113.

PELLETIER, J., CHEMINEAU, P., DELGADILLO, J. A. (1988). Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. In: Proc. 11th Int. Cong. Anim. A. I., Dublin vol. **5**, pp. 211-219.

PELLICER, M.T.R., MAGALLON, T., COMBARNOUS, Y. (1997). Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.*, **5**: 1023-1031.

POMARES, C.C., STOJANOV, T., EPPELSTON, J., MAXWELL, W.M.C. (1994). Effect of glutathione peroxidase on the survival of goat and ram spermatozoa during liquid storage. In: *Proc. 7th Int. Symp. On spermatology*, Cairns **vol. 9**, p. 24, (Abst.)

POMARES, C.C., STOJANOV, T., EPPELSTON, J., MAXWELL, W.M.C. (1995). The effect of antioxidants on the fertilising capacity of chilled-stored buck spermatozoa. In: *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. Ann. Conf.* **vol. 27**, Abst. No. 52.

PURDY, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum. Res.* **63**: 215-225.

RESTALL, B.J. (1991). Goat production in the Asian humid tropics. In: Norton, B.W., Saithanoo, D. (Editörler), Goat Production in Asian Humid Tropics, Proc. Int. Conf. Hat Yai, Thailand, pp. 74-83.

RITAR, A.J., SALAMON, S. (1982). Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* **35**, 305-312.

RITAR, A.J., SALAMON, S. (1983). Fertility of fresh and Frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* **36**, 49-59.

RITAR, A.J., SALAMON, S. (1991). Effect of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Rum. Res.* **4**, 29-37.

RITAR, A.J., BALL, P.D., O'MAY, P.J. (1990). Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fertil. Dev.* **2**, 27-34.

RITAR, A.J., MENDOZA, G., SALAMON, S., WHITE I.G. (1992). Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fert.* **95**:97-102

ROCA, J., CARRÍZOSA, J.A., CAMPOS, I., LAFUENTE, A., VAZQUEZ, J.M., MARTÍNEZ E. (1997). Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in tris egg yolk extender and stored at 5°C , *Small Rum. Res.* **25**; 147-153.

ROY, A. (1957). Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature (London)* 179, 318.

SALAMON, S., RITAR, A.J. (1982). Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* **35**, 295-303.

SEVİNÇ, A. (1979). Dölerme ve sun'i tohumlama. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.

SEVİNÇ, A., TEKİN, N., YURDAYDIN, N., KALE, N. (1985). Çifteler harası tiftik tekelerinin başlıca spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. *Doğa Bil. Der.*, **9(3)**: 264-273.

SIGNORET, J.P., COHEN-TANNOUDJI, J., GONZALEZ, R. (1990). Effect of socio-sexual interactions on endocrine secretions in the domestic sheep. In: *Hormones and Behaviour in Vertebrates: 2. Behavioural in males and females – social interactions and reproductive endocrinology*. Balthazart, J. (Editör), Comp. Physiol. Base Karger **vol. 9**, pp. 188-200.

SINGH, M.P., SINHA, A.K., SINGH, B.K. (1995). Effect of cryoprotectants on certain seminal plasma attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* **43**, 1047-1053.

SMITH, A.H., POLGE, C. (1950). Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature (London)* 166, 668-671.

SMITH, J.T., MAYER, D.T. (1955). Evaluation of sperm concentration by the hemocytometer method. *Fertil. Steril.*, **6**: 271-275.

STOJANOV, T., POMARES, C.C., MAXWELL, W.M.C., EPPLESTON, J. (1994). Effect of cytochrome c on the survival of ram and goat spermatozoa during liquid storage. In: *Proc. 7th as Jornadas Internacionales de Reproduccion Animal, Murcia*, p. 333, (Abst.)

TEKİN, N., YURDAYDIN, N., DAŞKIN, A. (1996). Ankara Keçilerinden değişik yöntemlerle sperma alınması ve değerlendirilmesi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **43**: 397-403

TULI, R.K., HOLTZ, W. (1992). The effect of season on seminal characters in Boer goat bucks in the Northern temperate zone. In: Recent Advances in Goat Production. *Proc. 5th Int. Conf. on Goats. New Delhi.* (Abst. No: 1195).

TULI, R.K., HOLTZ, W. (1994). Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and go-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* **42**, 547-555.

TULI, R.K., SCHMIDT-BAULAIN, R., HOLTZ, W. (1991). Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Anim. Reprod. Sci.* **25**, 125-131.

WAIDE, Y., NIWA, T., ASANUMA, R. (1977). Studies on the preservation of liquid and frozen semen of domestic animals: III. Viability and fertility of frozen goat spermatozoa. *Jpn. J. Anim. Reprod.* **23**, 129-137.

WALKDEN-BROWN, S.W., RESTALL, B.J., NORTON, B.W., SCARAMUZZI, R.J. (1994a). The 'female effect' in Australian cashmere goats: effect of season and quality of diet on the LH and testosterone response of bucks to oestrous does. *J. Reprod. Fert.* **100**, 521-531.

WALKDEN-BROWN, S.W., RESTALL, B.J., TAYLOR, W.A. (1994b). Testicular and epididymal sperm content in grazing cashmere bucks.: seasonal variation and prediction from measurements in vivo. *Reprod. Fertil. Dev.* **6**, 727-736.

WATSON, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**, 871-891.

YOKOKI, Y., OGASA, A. (1977). Effects of hypothermia on semen production in goats. *Jpn. J. Anim. Reprod.* **23(3)**, 93-98.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Ankara’ da doğdum. İlk öğrenimimi Malatya’ da, Orta ve Lise öğrenimimi Ankara’ da tamamladım. 1996 yılında girdiğim A.Ü. Veteriner Fakültesinden 2001 yılında mezun oldum. 2002 Eylül ayında A.Ü. Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun’ i Tohumlama Anabilim Dalında doktora başladım.