Kocatepe Veterinary Journal

Kocatepe Vet J. (2024):17(3):221-233

DOI: 10.30607/kvj.1453637

RESEARCH ARTICLE

Effect of Freezing Rate on the Freezability of Ram Semen Diluted with Tris Extenders of Different Properties

Mustafa SÖNMEZ[1], Abdoul Bhassit BONKOUNGOU[1], İbrahim Halil GÜNGÖR[1]*, Aslıhan ÇAKIR CİHANGİROĞLU[2], Tutku Can ACISU[1]

[1] Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye
[2] Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Siirt, Türkiye

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of different freezing rate on the motility rates and kinematic velocity parameter values of ram semen diluted with tris diluents prepared using standard and ultra-specific chemicals. Semen obtained from six different rams by the artificial vagina method was used in the study. The semen was individually divided into 2 equal parts. Then each group was diluted with one of the two tris diluents. The diluted semen was drawn into 0.25 ml straws and cooled to 4 °C. After equilibration, they were frozen in an automatic freezing device according to fast and slow freezing methods. After freezing, the straws were stored in liquid nitrogen tanks at -196 °C. Motility and kinematic parameter values were determined in thawed semen samples using CASA system. It was determined that the freezing of ram semen by dilution with Tris diluents of varying chemical composition did not affect the spermatological quality following thawing. On the other hand, the results indicated that the slow freezing method provided a significant increase in the rates of rapid spermatozoon, total motility and progressive motility after thawing in comparison to the fast freezing method for both diluents. In addition, when the results obtained following thawing were evaluated individually; it was observed that there were significant individual differences among the rams in terms of total and progressive motility rates. In conclusion, the use of the slow freezing method during the freezing of ram semen can provided more successful results in terms of post-thawing motility rates compared to the fast freezing method. Furthermore, it also appears that individual characteristics may be a crucial factor affecting the success of semen freezing in rams.

Keywords: Ram, Semen, Tris, Chemical Properties, Freezing Rate, Individuality.

***

Farklı Özellikteki Tris Sulandırıcıları ile Sulandırılan Koç Spermasının Dondurularak Saklanabilirliği Üzerine Dondurma Hızının Etkisi

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, standart ve ultra özellikteki kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanan tris sulandırıcıları ile sulandırılan koç spermasının motilite oranları ve kinematik hız parametre değerleri üzerine farklı dondurma hızlarının etkilerini araştırmaktı. Çalışmada altı farklı koçtan suni vajen yöntemi ile alınan spermalar kullanıldı. Alınan spermalar bireysel olarak 2 eşit kısma ayrıldı. Ardından her bir grup, iki tris sulandırıcısından biri ile sulandırıldı. Sulandırılan spermalar 0.25 ml payetlere çekilip 4°C'ye soğutuldu. Ekilibrasyondan sonra otomatik dondurma cihazında hızlı dondurma ve yavaş dondurma yöntemlerine göre donduruldu. Dondurma sonrası payetler -196 °C'deki sıvı azot tanklarında saklandı. Çözdürülen sperma örneklerinde CASA sistemi kullanılarak motilite ve kinematik parametre değerleri belirlendi. Koç spermasının farklı kimyasal içerikli Tris sulandırıcıları ile sulandırılarak dondurulmasının çözdürme sonrası spermatolojik kaliteyi etkilemediği tespit edildi. Diğer taraftan, her iki sulandırıcı için hızlı dondurma yöntemiyle karşılaştırıldığında yavaş dondurma yönteminin çözdürme sonrası total motilite, progresif motilite ve hızlı hareket eden spermatozoon oranlarında önemli derecede bir artış sağladığı gözlendi. Ek olarak çözdürme sonrası elde edilen sonuçlar bireysel olarak değerlendirildiğinde; koçlar arasında total ve progresif motilite yönünden önemli bireysel farklılıkların olduğu belirlendi. Sonuç olarak, koç spermasının dondurulması sırasında yavaş dondurma yönteminin kullanılması, hızlı dondurma yöntemine kıyasla çözdürme sonrası hareketlilik oranları açısından daha başarılı sonuçlar sağlayabilir. Ayrıca, bireysel özelliklerin koçlarda sperma dondurma işleminin başarısını etkileyen önemli bir faktör olabileceği de görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Koç, Sperma, Tris, Kimyasal Özellikler, Dondurma Hızı, Bireysellik.

To cite this article: Sönmez M. Bonkoungou AB. Güngör İH. Çakır Cihangiroğlu A. Acısu TC. Effect of Freezing Rate on the Freezability of Ram Semen Diluted with Tris Extenders of Different Properties. (2024):17(3): 221-233

Submission: 18.03.2024 **Accepted**: 02.09.2024 **Published Online**: 05.09.2024

ORCID ID; *MS: 0000-0003-0281-7228, ABB: 0009-0008-5354-792X, İHG: 0000-0002-5250-1478, AÇC: 0000-0003-3365-8960, TCA: 0000-0002-0882-937X*

*Corresponding author e-mail: ihgungor@firat.edu.tr

GİRİŞ

Erkek bir damızlık hayvandan uygun metot ve tekniklerle alınıp suni tohumlama uygulamalarında kullanılacak bir spermanın, muayenesi ve kontrolü yapıldıktan sonra mutlaka belirli işlemlerden geçirilerek sulandırılması ve uygun koşullarda soğutulup kısa süreli ya da dondurulup uzun süreli olarak saklanması gerekir. Spermanın dondurularak saklanabilmesi, özellikle spermanın uzun mesafeler arasında güvenilir bir şekilde transferini kolaylaştırmış ve uzun yıllar boyunca saklanabilen spermaların istenildiği zaman çözdürülerek kullanılması imkânını sağlamıştır. Bu durum, spermanın daha etkin bir şekilde kullanımını sağlayarak suni tohumlama uygulamalarının saha koşullarında uygulanabilirliğini ve yaygınlaşmasını artırmıştır (Hafez ve ark. 2000; Sönmez 2022; Salamon ve Maxwell 2000). Bununla birlikte, dondurulmuş bir spermanın çözdürme sonrası spermatolojik özellikler yönünden belirli kalite standartlarını sürdürmesi, elde edilen fertilite oranlarının istenilen düzeyde sağlanması açısından oldukça önemlidir (Yanez-Ortiz ve ark. 2022; Layek ve ark. 2022).

Birçok hayvan türünde spermanın başarılı bir şekilde dondurulmasında uygun sperma sulandırıcılarının geliştirilmesi oldukça önemli bir role sahip olup dondurma işlemleri öncesinde spermanın sulandırılmasında kullanılan sulandırıcının kimyasal içeriği, spermanın çözdürülmesi sonrası elde edilen motilite oranlarını etkileyebilen önemli faktörlerden birisi olarak kabul edilmektedir (Gil ve ark. 2003; Bearden ve ark. 2004). Günümüzde, Tris - Sitrik asit – Fruktoz - Yumurta sarısı - Gliserol içeren sperma sulandırıcısı, özellikle koç spermasının dondurulması amacıyla yapılan bilimsel çalışmalarda (Ustuner ve ark. 2014; Güngör ve ark. 2022; Zhang ve ark. 2024) yaygın olarak kullanılmakta olup güncelliğini devam ettirmektedir.

Belirli şirketlerce üretilip ticari olarak satışa sunulan kimyasal maddelerin, her ne kadar kimyasal formülleri aynı olsa da, üretim teknolojilerine göre molekül büyüklükleri ve saflık oranları önemli düzeyde değişkenlik gösterebilmektedir. Hatta ticari firmalar kendi ürün kataloglarında bir kimyasal maddenin aynı formüle sahip olmasına rağmen saflık derecesine göre farklı ürün seçeneklerini sunabilmektedir. Bu durum, kullanım amaçlarına göre kimyasal maddeler için bir tercih seçeneği oluşturmakla birlikte etkinlik ve saflık düzeylerinde göre satış fiyatlarının önemli derecede artmasına neden olmaktadır. Spermanın dondurulması amacıyla hazırlanan sperma sulandırıcıları düşünüldüğünde; bu sulandırıcılar hazırlanırken kullanılacak kimyasal maddelerin daha hassas teknoloji ile ultra saflıkta üretilmiş serilerinin tercih edilmesinin, standart teknoloji ile üretilmiş muadillerine göre dondurulup çözdürülme sonrası sperma kalitesini nasıl etkileyeceği merak konusudur.

Dondurulmuş bir spermanın çözdürme sonrası spermatolojik kalitesini etkileyen bir diğer faktör ise spermanın dondurulması işlemi sırasında uygulanan dondurma hızıdır (Kulíková ve ark. 2018; Vozaf ve ark. 2021). Donma anında gerçekleşen en önemli olay hücrenin kristalleşmesidir. Bu olay neticesinde oluşan önemli pH değişiklikleri; enzimatik reaksiyonların bozulmasına, hücrede oluşan dehidrasyon; hücre membran geçirgenliğinin değişmesine ve şekillenen geniş buz kristalleri ise; hücre membranında yırtılmalara sebep olmaktadır. Bununla birlikte, reaksiyon sırasında şekillenen buz kristalleri ne kadar küçük hacimli olursa, meydana gelen zarar da o kadar az olmaktadır (Watson 2000; Saha ve ark. 2022). Spermanın dondurulması sırasında spermatozoa membranındaki hasarlar, özellikle buz kristallerinin şekillenme devresi olarak kabul edilen 0 °C ile –20 °C arasındaki sıcaklıklarda meydana gelmekte olup bu aralığın çok hızlı geçilmesi buz kristallerinin şekillenme hızını artırmaktadır. Bu nedenle dondurma işleminin ilk aşaması olan 5 °C'den –20 °C'ye sıcaklığın düşürülmesi sırasındaki geçiş hızının oldukça iyi ayarlanması gereklidir (Watson 2000; Zamiri 2020).

Bu düşüncelerden yola çıkarak yürütülen bu çalışma; iki farklı üretim teknolojisi ile üretilmiş farklı saflık derecelerine sahip kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanan Tris - Sitrik asit – Fruktoz - Yumurta sarısı - Gliserol içeren sperma sulandırıcıları ile sulandırılan koç spermasının dondurulması aşamasında uygulanan hızlı ve yavaş dondurma hızı yöntemlerinin çözdürme sonrası motilite ve hareket hızı oranları ile bazı kinematik parametre değerler üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapıldı.

MATERYAL METOT

Araştırmanın Yeri

Araştırmada kullanılacak hayvanlar; Fırat Üniversitesi, Tarım ve Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezinden (TAHAM) temin edildi. Hayvanlardan spermanın alınması işlemleri Fırat Üniversitesi, Hayvan Hastanesi, Hospitalizasyon birimindeki padoklarda gerçekleştirilirken, spermanın muayeneleri ise Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Androloji Laboratuvarında yapıldı. Çalışma için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (FÜHADYEK)'ndan onay alındı (Tarih: 16.11.2022 - Protokol No: 2022/18-09).

Hayvan Materyali

Araştırmada hayvan materyali olarak 2 yaşlarında, klinik olarak sağlıklı, fertilitesi bilinen 65-70 kg canlı ağırlığında olan 6 baş Akkaraman ırkı koç kullanıldı. Uygulamalar süresince hayvanlara konsantre ve kaliteli kaba yem verildi. İçme suyu ad libitum olarak sağlandı.

Deneysel Aşama

Spermanın Alınması

Deneysel aşamalar sırasında koçlar ve koyun ayrı padoklarda tutuldu. Çalışma üreme mevsiminde gerçekleştirildi. Sperma alma döneminde koyunda seksüel uyarımın devamlılığı için 5 mg / 2mL dozunda

17-β-östradiol susam yağı içerisinde çözdürülerek uygulandı. Yapılan hormonal uygulamalarla kızgınlığa getirilen koyuna seksüel stimülasyon sağlanmış koçların atlaması sağlanarak suni vajen yöntemiyle sperma alındı. Bu işlem, haftada iki kez ve günün aynı saatlerinde (09.00-11.00) gerçekleştirildi. Çalışma boyunca, en az 0,8 ml hacme sahip, yoğunluğu 3 milyar/ml'nin üzerinde olan, başlangıç total motilitesi %80'in üzeri ve progresif motilite değeri ise %40'ın üzeri olan sperma örnekleri kullanıldı. Araştırmanın deneysel aşaması 6 tekrar olarak gerçekleştirildi.

Spermanın Sulandırılması, Paketlenmesi ve Soğutulması

Her bir koçtan alınan ejakülat, hacmi kaydedildikten sonra 37 °C'de su içeren bir beherglassa konularak hızlı bir şekilde laboratuvara taşındı. Laboratuvara getirilen ve ön muayeneleri yapılan sperma örnekleri otomatik pipet yardımıyla iki eşit kısma ayrılıp falkon tüplerine aktarıldı. Bu işlemin ardından her bir grup sperma; 37°C'deki etüvde tutulan iki farklı teknoloji ile üretilmiş (hassas teknoloji; TRS-H ya da standart teknoloji; TRS-S) kimyasal maddeler kullanılarak aynı oranlarda hazırlanmış Tris - Sitrik asit – Fruktoz - Yumurta sarısı - Gliserol içerikli sperma sulandırıcılarından biri ile (Tablo 1) 1:2 oranında sulandırılıp ön sulandırmaları yapıldı. Ön sulandırılması yapılmış her bir spermanın yoğunluğu ve motilite oranı belirlenerek son hacimlerinde mililitrede 400 milyon motil spermatozoa olacak şekilde aynı sperma sulandırıcısı ile sulandırılma işlemleri tamamlandı.

Sulandırılmış tüm sperma örnekleri; ayarlanabilir özel soğutma kabinine yerleştirildikten sonra sıcaklıkları 30 dakika içerisinde (2 dakikada 1 °C olacak şekilde) 37 °C'den 22 °C'ye (oda sıcaklığına) düşürüldü. Bu sıcaklıkta, sperma örnekleri 0.25 ml plastik payetlere çekilip uçları kapatılarak metal dondurma raflarına dizildi. Bu raflar üzerinde ayarlanabilir özel soğutma kabinine yerleştirilen payetlerin sıcaklığı ise yaklaşık 90 dakika içerisinde (5 dakikada 1 °C olacak şekilde) 23 °C'den 5 °C'ye düşürüldü. Soğutma işleminin ardından 5 °C'de tüm sulandırılmış sperma örnekleri 3 saat süreyle ekilibrasyona tabi tutuldu.

Spermanın Dondurulması

Ekilibrasyon süresinin tamamlanmasının ardından her bir grup sperma örneği; iki alt gruba ayrıldı (toplamda 4 grup). Bilgisayar sistemli otomatik dondurma kabinine (Micro-Digitcool™, PAF, IMV, Fransa) yerleştirilen payetler sırasıyla sıvı azot buharı yardımıyla hızlı (8 dakikalık program) ve yavaş (24 dakikalık program) dondurma prosedürlerine göre (Tablo 2) dondurulduu (Byrne ve ark. 2000; Güngör ve ark. 2022). Dondurma işleminin tamamlanmasının ardından dondurulmuş sperma payetleri gruplarına göre hızlı bir şekilde plastik gobletlere konulup sıvı azot tanklarına aktarılarak gerekli muayeneler yapılıncaya kadar bu tanklarda -196 °C'deki sıvı azot içerisinde saklandı.

Dondurulmuş Spermanın Çözdürülmesi

Dondurma işleminden en az 24 saat sonra dondurulmuş sperma içeren payetler sıvı azot tankından hızlı bir şekilde alınıp 37 °C'deki su banyosu içinde 25 saniye süreyle çözdürüldü. Daha sonra, payetin uç kısmı kesilerek bir ependorf tüpe aktarılan çözdürülmüş sperma örnekleri, muayeneler tamamlanıncaya kadar sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış özel ısıtma ünitesinde muhafaza edildi.

CASA Sistemi Yardımıyla Çözdürme Sonrası Motilite ve Hareket Hızı Oranları ile Kinematik Parametre Değerlerinin Belirlenmesi

Sperma örneklerine ait motilite oranları ile kinematik parametre değerleri; Bilgisayar Destekli Sperm Analiz (CASA) cihazıyla (ISASv1.2, Proiser ® İspanya) belirlendi. Muayene sırasında, her bir sperma örneğinden alınan numune, görüntü alanına düşen spermatozoon sayısı 100-150 adet olacak şekilde tris buffer solüsyonu ile 1:10 oranında sulandırıldı. Daha sonra CASA sistemine bağlı faz-kontrast mikroskobun 37 °C'ye ayarlanmış ısıtma tablalı sehpasına konulmuş olan lam (Spermtrack-20 μm®) üzerine sulandırılmış örnekten 3 μL aktarılarak üzerine özel lameli kapatıldı. Ardından bilgisayarlı görüntü sistemi üzerinden en az 5 farklı saha incelenerek ortalama değerler kaydedildi (Güngör ve ark. 2022; Sönmez ve Fırat 2022). Bu muayene esnasında total ve progresif motilite değerleri ile spermatozoonların hız değerleri dikkate alınarak belirlenen; çok hızlı hareket eden spermatozoonlar (rapid), orta hızda hareket eden spermatozoonlar (medium), yavaş hareket eden spermatozoonlar (slow) ve hareket etmeyen spermatozoonlar (statik) şeklinde bir sınıflandırma yapılarak bunların oraları "%" şeklinde ifade edildi. Buna ilaveten, spermatozoonların hareket özelliklerine bağlı olarak oluşan kinematik parametrelerine ait değerlerde [VCL-eğrisel yol hızı (μm/s); VAP-ortalama yol hızı (μm/s); VSL-doğrusal yol hızı (μm/s); LIN-eğrisel yolun doğrusallığı (%); STR-ortalama yolun doğrusallığı (%), WOB-kararsızlık ölçüsü (%) belirlendi (Şekil 1). Yapılan analizler sırasında koç sperması için standart prosedür olarak görüntü süresi; 10 sn, görüntü hızı; 25 kare/sn, hız ölçütleri; 10 < slow < 45 < medium <75 < rapid ve STR değeri; %80 olarak uygulandı (İnanç ve ark. 2017; Özer Kaya ve ark. 2021).

İstatistiki Analiz

İstatistiki analizler için SPSS (Version 22.0) istatistik programı kullanıldı. Elde edilen veriler ortalama ± standart hata olarak sunuldu. Ham verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerini tespit etmek için Kolmogorow-Smirnow normallik analizi yapıldı. Parametrik dağılım gösteren değerler arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi için Varyans analizi (One-Way ANOVA) ve ikili karşılaştırmalar için ise post-hoc Tukey-HSD testi kullanıldı. Tüm analizlerde p değerinin 0.05'den daha az olduğu durumlar istatistiksel açıdan önemli olarak kabul edildi.

Tablo 1. Hazırlanan sulandırıcıların kimyasal içerikleri.

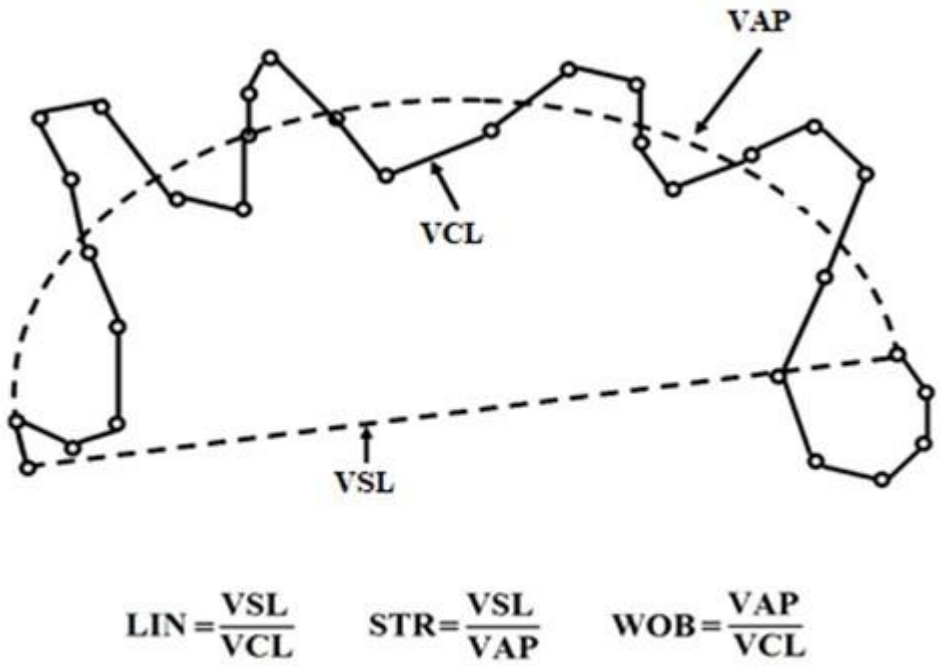
Table 1. Chemical contents of the prepared diluents.

Kimyasal Madde	**Miktarı**	**Standart İçerikli TRİS Sulandırıcı (TRS-S)**	**Hassas İçerikli TRİS Sulandırıcı (TRS-H)**
Tris (hidroksimetilen) aminomethane	3,63 gr	Trizma® Base Standard (Sigma, T1503)	Trizma® Base Bioxtra (Sigma, T6791)
Sitrik Asit	1,99 gr	Citric Acid (Sigma, C7129)	Citric Acid Bioxtra (Sigma, C0706)
Fruktoz	0,25 gr	Fructose (Sigma, F0127)	Fructose Bioxtra (Sigma, F2543)
Yumurta Sarısı	%16	Günlük taze tavuk yumurtasından filtrelenerek elde edilmiş ve her iki sulandırıcı için ortak kullanılmıştır.	
Gliserol	%5	Glycerol Bioxtra (Sigma, G6279) (her iki sulandırıcı için ortak kullanılmıştır.)	

Tablo 2. Otomatik dondurma kabininde koç spermasının dondurulması için dondurulma hızı yöntemleri.

Table 2. Freezing rate methods for freezing ram semen in the automatic freezer cabinet

Hızlı Dondurma Yöntemi				**Yavaş Dondurma Yöntemi**		
Sıcaklık Değişimi	**Soğutma Hızı**	**Süresi**		**Sıcaklık Değişimi**	**Soğutma Hızı**	**Süresi**
+5°C'den -10°C'ye	Dakikada 5°C	3,0 dk		+5°C'den -10°C'ye	Dakikada 1°C	15,0 dk
-10°C'den -20°C'ye	Dakikada 10°C	1,0 dk		-10°C'den -20°C'ye	Dakikada 2°C	5,0 dk
-20°C'den -100°C'ye	Dakikada 40°C	2,0 dk		-20°C'den -100°C'ye	Dakikada 40°C	2,0 dk
-100°C'den -140°C'ye	Dakikada 20°C	2,0 dk		-100°C'den -140°C'ye	Dakikada 20°C	2,0 dk
	Toplam süre	**8,0 dk**			**Toplam süre**	**24,0 dk**



Şekil 1: Spermatozoonun kinematik hız parametrelerinin şematik görünümü.

Figure 1: Schematic view of kinematic speed parameters of spermatozoon.

BULGULAR

Farklı özellikteki kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanan sperma sulandırıcıları ile sulandırılıp hızlı ve yavaş dondurma hızı yöntemleri kullanılarak dondurulan koç spermasının çözdürme sonrası belirlenen total motilite, progresif motilite ve hareketsiz (statik) spermatozoon oranları Tablo 3'de sunuldu. Sunulan değerler incelendiğinde; farklı özellikteki kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanan sulandırıcılar ile spermaların sulandırılmasının; her iki dondurma yöntemi için de çözdürme sonrası total motilite ve progresif motilite oranlarında kısmi bir sayısal artış; hareketsiz (statik) spermatozoon oranında ise kısmi bir sayısal azalma sağlamasına rağmen bu farklılıkların istatistiki yönden önemli olmadığı ($p>0,05$) tespit edildi. Diğer taraftan belirlenen değerler dondurma hızlarına göre değerlendirildiğinde ise; kullanılan her iki sulandırıcı için de uzun süreli dondurma yönteminin kısa süreli dondurma yöntemine göre çözdürme sonrası total ve progresif motilite oranlarında önemli derecede bir artış ($p<0,05$) ve hareketsiz (statik) spermatozoon oranında ise önemli derecede bir azalma sağladığı ($p<0,05$) belirlendi.

Farklı özellikteki kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanan sperma sulandırıcıları ile sulandırılıp hızlı ve yavaş dondurma hızı yöntemleri kullanılarak dondurulan koç spermasının çözdürme sonrası belirlenen spermatozoon hız oranları Tablo 4'de sunuldu. Sunulan bu değerler incelendiğinde; farklı özellikteki kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanan sulandırıcılar ile spermaların sulandırılmasının; her iki dondurma yöntemi için de çözdürme sonrası hızlı (rapid) spermatozoon oranın da kısmi bir sayısal artış sağlamasına rağmen bu farklılıkların istatistiki yönden önemli olmadığı ($p>0,05$) tespit edildi. Diğer taraftan belirlenen değerler dondurma hızlarına göre değerlendirildiğinde ise; kullanılan her iki sulandırıcı için de uzun süreli dondurma yönteminin kısa süreli dondurma yöntemine göre çözdürme sonrası hızlı hareket eden (rapid) spermatozoon oranın da önemli derecede bir artış ($p<0,05$) sağladığı belirlendi. Buna ilaveten, hem sulandırıcı özelliği hem de dondurma yöntemleri açısından yapılan değerlendirmede çözdürme sonrası orta hızda hareket eden (medium) ve yavaş hareket eden (slow) spermatozoon oranları yönünden önemli bir farklılık ($p>0,05$) gözlenmedi.

Farklı özellikteki kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanan sperma sulandırıcıları ile sulandırılıp hızlı ve yavaş dondurma hızı yöntemleri kullanılarak dondurulan koç spermasının çözdürme sonrası spermatozoanın hızlarına ve doğrusallıklarına göre belirlenen kinematik parametre değerleri Tablo 5 ve Tablo 6'da gösterildi. Sunulan değerler incelendiğinde; hem sulandırıcı özelliği hem de dondurma yöntemleri açısından çözdürme sonrası VCL, VAP ve VSL yol hızı değerlerinde ve LIN, STR ve WOB doğrusallık oranlarında istatistiki yönden önemli bir farklılığın olmadığı ($p>0,05$) tespit edildi.

Çözdürme sonrası elde edilen sonuçlar koçlar arasında bireysel olarak değerlendirildiğinde ise; total motilite, progresif motilite, hızlı hareket eden ve hareketsiz (statik) spermatozoon oranı yönünden koçlar arasında önemli bireysel farklılıkların olduğu ($p<0,05$) göze çarptı.

Tablo 3. Farklı özellikteki tris sulandırıcılarıyla sulandırılıp hızlı ve yavaş dondurma hızı uygulanarak dondurulan koç spermalarının çözdürme sonrası total motilite, progresif motilite ve hareketsiz spermatozoon oranları.

Table 3. Total motility, progressive motility and immotile spermatozoon rates after thawing of ram semen diluted with Tris extenders of different properties and frozen at fast and slow freezing rates.

	Total Motilite Oranı (%)				**Progresif Motilite Oranı (%)**				**Hareketsiz (Statik) Spermatozoon Oranı (%)**			
	Kısa Süreli Dondurma		**Uzun Süreli Dondurma**		**Kısa Süreli Dondurma**		**Uzun Süreli Dondurma**		**Kısa Süreli Dondurma**		**Uzun Süreli Dondurma**	
	Tris-S	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**
K-1	$35,4\pm5,7^{ABa}$	$40,8\pm4,6^{ABa}$	$42,6\pm8,2^{ABCa}$	$53,2\pm3,4^{BCa}$	$16,9\pm5,7^{Ba}$	$23,5\pm2,1^{Ca}$	$20,0\pm5,5^{ABa}$	$25,6\pm2,7^{BCa}$	$64,6\pm5,7^{ABa}$	$59,2\pm4,6^{ABa}$	$57,4\pm8,2^{ABCa}$	$46,8\pm3,4^{BCa}$
K-2	$21,1\pm3,5^{Aa}$	$26,8\pm2,8^{Aab}$	$33,4\pm2,3^{ABab}$	$39,5\pm3,9^{ABb}$	$9,8\pm1,8^{ABa}$	$12,5\pm0,7^{ABab}$	$16,3\pm1,3^{ABb}$	$17,5\pm1,4^{ABb}$	$78,9\pm3,5^{Aa}$	$73,2\pm2,8^{Aab}$	$66,6\pm2,3^{ABab}$	$60,5\pm3,9^{ABb}$
K-3	$30,7\pm2,5^{ABa}$	$36,3\pm1,4^{Aa}$	$58,2\pm1,5^{Cb}$	$61,1\pm2,8^{Cb}$	$11,8\pm1,5^{ABa}$	$15,5\pm0,9^{ABCa}$	$26,1\pm2,0^{Bb}$	$26,7\pm2,2^{BCb}$	$69,3\pm2,5^{ABa}$	$63,7\pm1,4^{Aa}$	$41,8\pm1,5^{Cb}$	$38,9\pm2,8^{Cb}$
K-4	$32,3\pm2,6^{ABa}$	$31,7\pm2,6^{Aa}$	$58,5\pm2,6^{Cb}$	$58,1\pm2,1^{Cb}$	$17,6\pm0,5^{Ba}$	$19,3\pm0,9^{ABCa}$	$26,6\pm1,8^{Bb}$	$28,5\pm2,2^{Cb}$	$67,7\pm2,6^{ABa}$	$68,3\pm2,6^{Aa}$	$41,5\pm2,6^{Cb}$	$41,9\pm2,1^{Cb}$
K-5	$43,3\pm6,6^{Ba}$	$53,2\pm4,2^{Bab}$	$51,5\pm1,8^{BCab}$	$58,8\pm3,8^{Cb}$	$16,9\pm1,6^{Ba}$	$21,3\pm3,4^{BCab}$	$19,9\pm1,6^{ABab}$	$29,0\pm3,3^{Cb}$	$56,7\pm6,6^{Ba}$	$46,8\pm4,2^{Bab}$	$48,5\pm1,8^{BCab}$	$41,2\pm3,8^{Ca}$
K-6	$18,2\pm1,7^{Aa}$	$26,7\pm4,1^{Aab}$	$26,8\pm5,4^{Aab}$	$35,1\pm2,7^{Aa}$	$6,9\pm1,4^{Aa}$	$10,3\pm2,6^{Aab}$	$12,0\pm2,3^{Aab}$	$15,4\pm1,0^{Ab}$	$81,8\pm1,7^{Aa}$	$73,3\pm4,1^{Aab}$	$73,2\pm5,4^{Aab}$	$64,9\pm2,7^{Ab}$
GNL	**$30,1\pm2,3^{a}$**	**$35,9\pm2,3^{ab}$**	**$45,2\pm3,0^{bc}$**	**$51,0\pm2,4^{c}$**	**$13,3\pm1,3^{a}$**	**$17,1\pm1,2^{ab}$**	**$20,2\pm1,5^{bc}$**	**$23,8\pm1,4^{c}$**	**$69,9\pm2,3^{a}$**	**$64,1\pm2,3^{ab}$**	**$54,8\pm3,0^{bc}$**	**$49,0\pm2,4^{c}$**

$^{A, B, C}$: Her bir parametre için aynı sütun içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$).
$^{a, b, c}$: Her bir parametre için aynı satır içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$).
Tris-S: standart teknoloji ile üretilmiş kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanmış tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-gliserol içerikli sperma sulandırıcısı
Tris-H: hassas teknoloji ile üretilmiş kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanmış tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-gliserol içerikli sperma sulandırıcısı
$^{A, B, C}$: Differences between mean values with different letters in the same column for each parameter are statistically significant ($p<0.05$).
$^{a, b, c}$: Differences between mean values with different letters in the same row for each parameter are statistically significant ($p<0.05$).
Tris-S: semen extender containing tris-citric acid-fructose-egg yolk-glycerol prepared using chemical substances produced with standard technology
Tris-H: semen extender containing tris-citric acid-fructose-egg yolk-glycerol prepared using chemicals produced with sensitive technology.

Tablo 4. Farklı özellikteki tris sulandırıcılarıyla sulandırılıp hızlı ve yavaş dondurma hızı uygulanarak dondurulan koç spermalarının çözdürme sonrası hızlı, orta hızda ve yavaş hareket eden spermatozoon oranları

Table 4. The rates of rapid, medium and slow moving spermatozoon after thawing of ram semen diluted with Tris extenders of different properties and frozen at fast and slow freezing rates.

	Hızlı Hareket Eden (Rapid) Spermatozoon Oranı (%)				**Orta Hızda Hareket Eden (Medium) Spermatozoon Oranı (%)**				**Yavaş Hareket Eden (Slow) Spermatozoon Oranı (%)**			
	Kısa Süreli Dondurma		**Uzun Süreli Dondurma**		**Kısa Süreli Dondurma**		**Uzun Süreli Dondurma**		**Kısa Süreli Dondurma**		**Uzun Süreli Dondurma**	
	Tris-S	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**
K-1	19,8±4,7^{ABa}	29,0±3,8^{Ba}	26,6±7,6^{ABa}	32,0±5,6^{ABCa}	6,4±1,8^{Aa}	4,3±1,0^{ABa}	4,5±1,0^{Aa}	10,1±2,0^{Aa}	9,2±3,5^{Aa}	7,5±1,6^{Aa}	11,6±2,9^{Aa}	11,1±2,4^{Aa}
K-2	12,9±2,2^{ABa}	16,6±1,9^{Aab}	19,7±1,9^{ABab}	23,5±2,6^{ABb}	2,5±0,4^{Aa}	3,0±1,0^{Aa}	4,9±0,9^{Aa}	5,6±1,3^{Aa}	5,7±1,4^{Aa}	7,2±1,9^{Aa}	8,8±0,5^{Aa}	10,4±0,8^{Aa}
K-3	16,9±2,5^{ABa}	22,1±0,7^{ABa}	38,3±4,6^{Bb}	42,0±3,3^{Cb}	4,6±1,1^{Aa}	4,6±1,5^{ABa}	6,9±1,0^{Aa}	4,8±1,6^{Aa}	9,1±2,0^{Aa}	9,6±1,3^{ABa}	13,0±4,1^{Aa}	14,3±3,0^{Aa}
K-4	21,7±1,6^{ABa}	23,4±2,1^{ABa}	34,3±3,1^{Bb}	39,5±1,4^{BCb}	4,2±1,1^{Aa}	2,5±0,5^{Aa}	6,6±0,9^{Aa}	6,2±1,2^{Aa}	6,3±1,1^{Aa}	5,8±0,8^{Aa}	17,6±3,9^{Ab}	12,4±2,1^{Aab}
K-5	24,0±1,2^{Ba}	28,1±4,7^{Ba}	32,1±3,3^{Ba}	35,6±6,1^{ABCa}	5,2±1,1^{Aa}	8,1±1,6^{Ba}	8,1±0,9^{Aa}	8,7±2,6^{Aa}	14,1±5,1^{Aa}	17,0±3,0^{Ba}	11,3±3,1^{Aa}	14,6±2,9^{Aa}
K-6	10,4±0,6^{Aa}	16,7±3,0^{Aab}	12,8±2,8^{Aab}	21,5±1,6^{Aa}	2,0±0,4^{Aa}	3,0±0,3^{Aa}	4,0±1,2^{Aa}	4,2±0,8^{Aa}	5,8±1,7^{Aa}	7,0±1,2^{Aa}	10,0±2,4^{Aa}	9,4±3,5^{Aa}
GNL	**17,6±1,3^{a}**	**22,6±1,5^{ab}**	**27,3±2,4^{bc}**	**32,3±2,1^{c}**	**4,1±0,5^{a}**	**4,3±0,6^{a}**	**5,8±0,5^{a}**	**6,6±0,8^{a}**	**8,4±1,2^{a}**	**9,0±1,0^{a}**	**12,0±1,2^{a}**	**12,0±1,0^{a}**

$^{A, B, C}$: Her bir parametre için aynı sütun içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$).
$^{a, b, c}$: Her bir parametre için aynı satır içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$).
Tris-S: standart teknoloji ile üretilmiş kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanmış tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-gliserol içerikli sperma sulandırıcısı
Tris-H: hassas teknoloji ile üretilmiş kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanmış tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-gliserol içerikli sperma sulandırıcısı
$^{A, B, C}$: Differences between mean values with different letters in the same column for each parameter are statistically significant ($p<0.05$).
$^{a, b, c}$: Differences between mean values with different letters in the same row for each parameter are statistically significant ($p<0.05$).
Tris-S: semen extender containing tris-citric acid-fructose-egg yolk-glycerol prepared using chemical substances produced with standard technology
Tris-H: semen extender containing tris-citric acid-fructose-egg yolk-glycerol prepared using chemicals produced with sensitive technology.

Tablo 5. Farklı özellikteki tris sulandırıcılarıyla sulandırılıp hızlı ve yavaş dondurma hızı uygulanarak dondurulan koç spermalarının çözdürme sonrası spermatozoonların hızlarına ait kinematik parametre değerleri

Table 5. Kinematic parameters of spermatozoa velocities after thawing of ram semen diluted with Tris extenders of different properties and frozen at fast and slow freezing rates.

	VCL				**VAP**				**VSL**			
	Kısa Süreli Dondurma		**Uzun Süreli Dondurma**		**Kısa Süreli Dondurma**		**Uzun Süreli Dondurma**		**Kısa Süreli Dondurma**		**Uzun Süreli Dondurma**	
	Tris-S	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**
K-1	100,3±5,4^{Aa}	124,7±9,3^{Aa}	111,7±5,0^{ABa}	114,9±4,5^{ABa}	65,4±7,5^{Aa}	96,3±14,9^{Aa}	75,2±6,3^{ABa}	75,6±6,2^{ABa}	53,8±8,5^{Aa}	87,4±16,1^{Aa}	63,5±6,4^{ABa}	61,7±3,9^{ABa}
K-2	107,5±5,0^{Aa}	113,6±7,5^{Aa}	117,6±4,8^{ABa}	103,8±5,4^{Aa}	74,9±7,2^{Aa}	80,3±10,5^{ABa}	92,2±4,6^{ABa}	68,5±8,5^{Aa}	61,0±6,2^{Aa}	69,0±9,4^{Aa}	78,7±4,8^{ABa}	54,4±5,6^{Aa}
K-3	99,7±3,5^{Aa}	108,3±9,9^{Aab}	119,7±3,3^{ABab}	131,6±6,0^{Bb}	69,3±8,4^{Aa}	73,0±12,9^{Aa}	80,7±6,0A^{Ba}	92,7±11,1^{ABa}	55,5±8,9^{Aa}	60,5±11,5^{Aa}	64,7±4,9^{ABa}	75,6±11,1^{ABa}
K-4	115,6±9,9^{Aa}	114,7±5,1^{Aa}	126,4±10,6^{Ba}	125,9±6,1^{ABa}	88,5±13,2^{Aa}	80,2±3,8^{Aa}	100,3±11,9^{Ba}	97,6±7,6^{Ba}	79,2±12,6^{Aa}	71,4±5,1^{Aa}	86,2±11,5^{Ba}	78,5±5,7^{Ba}
K-5	119,1±7,6^{Aa}	105,1±5,7^{Aa}	110,4±3,7^{ABa}	111,5±9,9^{ABa}	83,2±10,7^{Aa}	72,1±5,9^{Aa}	62,4±4,9^{Aa}	81,0±11,2^{ABa}	67,1±11,0^{Aa}	57,7±5,2^{Aa}	47,1±5,0^{Aa}	67,1±9,4^{ABa}
K-6	102,8±6,9^{Aa}	117,5±7,6^{Aa}	98,3±7,9^{Aa}	116,7±8,7^{ABa}	61,4±8,4^{Aa}	72,7±13,9^{Aa}	68,8±13,7^{Aa}	68,1±2,6^{Aa}	51,6±9,6^{Aa}	54,5±11,5^{Aa}	58,6±13,2^{ABa}	56,3±2,3^{ABa}
GNL	**107,5±2,9^{a}**	**113,9±3,1^{a}**	**114,0±3,0^{a}**	**117,4±3,2^{a}**	**73,8±4,0^{a}**	**79,1±4,4^{a}**	**79,9±4,1^{a}**	**80,6±3,8^{a}**	**61,4±4,0^{a}**	**66,8±4,4^{a}**	**66,5±4,0^{a}**	**65,6±3,2^{a}**

$^{A, B, C}$: Her bir parametre için aynı sütun içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$).
$^{a, b, c}$: Her bir parametre için aynı satır içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$).
Tris-S: standart teknoloji ile üretilmiş kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanmış tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-gliserol içerikli sperma sulandırıcısı
Tris-H: hassas teknoloji ile üretilmiş kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanmış tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-gliserol içerikli sperma sulandırıcısı
VCL: Eğrisel (Gerçek) Yol Hızı, VAP Ortalama Yol Hızı, VSL: Doğrusal Yol Hızı
$^{A, B, C}$: Differences between mean values with different letters in the same column for each parameter are statistically significant ($p<0.05$).
$^{a, b, c}$: Differences between mean values with different letters in the same row for each parameter are statistically significant ($p<0.05$).
Tris-S: semen extender containing tris-citric acid-fructose-egg yolk-glycerol prepared using chemical substances produced with standard technology
Tris-H: semen extender containing tris-citric acid-fructose-egg yolk-glycerol prepared using chemicals produced with sensitive technology.
VCL: Curvilinear velocity, VAP Average path velocity, VSL: Straight line velocity

Tablo 6. Farklı özellikteki tris sulandırıcılarıyla sulandırılıp hızlı ve yavaş dondurma hızı uygulanarak dondurulan koç spermalarının çözdürme sonrası spermatozoonların doğrusallıklarına ait kinematik parametre değerleri

Table 6. Kinematic parameters of spermatozoa linearity after thawing of ram semen diluted with Tris-based semen extenders prepared with chemical substances of different purity and frozen at fast and slow freezing rates.

	LIN				**STR**				**WOB**			
	Kısa Süreli Dondurma		**Uzun Süreli Dondurma**		**Kısa Süreli Dondurma**		**Uzun Süreli Dondurma**		**Kısa Süreli Dondurma**		**Uzun Süreli Dondurma**	
	Tris-S	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**	**Tris-S**	**Tris-U**
K-1	53,5±7,4^{Aa}	68,5±8,1^{Aa}	57,1±6,2^{Aa}	53,5±1,6^{Aa}	80,9±5,5^{Aa}	89,5±3,0^{Ba}	84,1±2,0^{ABa}	82,0±3,0^{Aa}	65,0±5,7^{Aa}	76,0±6,7^{Aa}	67,7±6,2^{ABa}	65,6±3,5^{ABa}
K-2	56,8±5,4^{Aa}	60,0±4,3^{Aa}	66,9±3,3^{Aa}	52,1±3,3^{Aa}	81,5±3,8^{Aa}	85,9±2,6^{Ba}	85,2±1,6^{Ba}	79,9±2,4^{Aa}	69,4±4,6^{Aa}	69,8±4,4^{Aa}	78,4±2,3^{ABa}	65,4±4,8^{ABa}
K-3	55,1±7,3^{Aa}	54,6±5,4^{Aa}	54,2±4,4^{Aa}	56,7±6,4^{Aa}	79,0±3,4^{Aa}	82,5±1,2^{ABa}	80,2±2,2^{ABa}	80,7±2,8^{Aa}	69,1±6,5^{Aa}	65,9±5,6^{Aa}	67,5±5,1^{ABa}	69,9±6,0^{ABa}
K-4	67,3±4,7^{Aa}	63,1±6,7^{Aa}	67,3±3,7^{Aa}	62,2±2,0^{Aa}	89,2±3,2^{Aa}	88,9±3,4^{Ba}	85,4±1,7^{Ba}	80,8±2,9^{Aa}	75,5±4,3^{Aa}	70,6±5,6^{Aa}	78,7±3,2^{Aa}	77,2±2,8^{Aa}
K-5	55,5±6,8^{Aa}	55,2±5,2^{Aa}	42,5±3,5^{Aa}	60,0±4,9^{Aa}	79,4±3,3^{Aa}	80,0±2,6^{ABa}	75,0±2,3^{Aa}	82,8±0,4^{Aa}	69,3±6,3^{Aa}	68,8±5,1^{Aa}	56,5±3,3^{Ba}	72,4±5,8^{ABa}
K-6	51,9±11,4^{Aa}	45,7±8,5^{Aa}	57,7±8,8^{Aa}	49,0±4,3^{Aa}	82,4±5,6^{Aa}	74,0±2,5^{Ba}	84,0±2,7^{ABa}	82,8±2,8^{Aa}	61,0±9,9^{Aa}	61,3±10,5^{Aa}	68,2±8,9^{ABa}	59,2±5,9^{Ba}
GNL	**56,7±2,9^{a}**	**57,8±2,8^{a}**	**57,6±2,6^{a}**	**55,6±1,8^{a}**	**82,1±1,7^{a}**	**83,4±1,5^{a}**	**82,3±1,1^{a}**	**81,5±1,0^{a}**	**68,2±2,5^{a}**	**68,7±2,6^{a}**	**69,5±2,5^{a}**	**68,3±2,1^{a}**

$^{A, B, C}$: Her bir parametre için aynı sütun içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$).
$^{a, b, c}$: Her bir parametre için aynı satır içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$).
Tris-S: standart teknoloji ile üretilmiş kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanmış tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-gliserol içerikli sperma sulandırıcısı
Tris-H: hassas teknoloji ile üretilmiş kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanmış tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-gliserol içerikli sperma sulandırıcısı
LIN: Gerçek Yolun Doğrusallığı, STR: Ortalama Yolun Doğrusallığı, WOB: Yalpalama
$^{A, B, C}$: Differences between mean values with different letters in the same column for each parameter are statistically significant ($p<0.05$).
$^{a, b, c}$: Differences between mean values with different letters in the same row for each parameter are statistically significant ($p<0.05$).
Tris-S: semen extender containing tris-citric acid-fructose-egg yolk-glycerol prepared using chemical substances produced with standard technology
Tris-H: semen extender containing tris-citric acid-fructose-egg yolk-glycerol prepared using chemicals produced with sensitive technology.
LIN: Linearity, STR: Straightness, WOB: Wobble

TARTIŞMA

Spermanın sulandırılmasında kullanılan sulandırıcının bileşimi, sulandırma oranı, ilave edilen gliserol oranı, ekilibrasyon süresi, dondurma yöntemi, dondurma hızı ve çözme sıcaklığı; koç spermasının başarılı bir şekilde dondurulmasını etkileyen en önemli faktörler olarak sıralanabilir. Bu araştırmada, farklı yöntemlerle üretilmiş kimyasal maddelerle hazırlanan Tris temelli sulandırıcıların ve dondurma sırasında farklı dondurma hızı uygulanmasının koç spermasının çözdürme sonrası sperma kalitesi üzerindeki etkileri incelendi.

Yapılan birçok bilimsel çalışma (Ustuner ve ark. 2014; Güngör ve ark. 2022; Zhang ve ark. 2024), Tris - Sitrik asit – Fruktoz - Yumurta sarısı - Gliserol içeren sperma sulandırıcısının koç spermasının dondurulması amacıyla kullanılan temel sperma sulandırıcı olduğu görülmektedir. Tris (hidroksimetilen) aminomethane, sperm hücresinin içerisine girebilme ve pH değişimlerine karşı hücreler arası güçlü bir tamponlama özelliğine sahip olup uygun konsantrasyonlarda spermatozoa üzerine toksik etki göstermeyen ve izotonik bir ortam sağlanması amacıyla kullanılan bir maddedir. Hazırlanan tris buffer solüsyonunun istenilen pH ve osmatik basınç düzeyine ulaşması için ise genellikle sulandırıcıya sitrik asit ilavesi yapılmaktadır. Bunun yanında, bu solüsyona spermanın saklanması sırasında spermatozoa için gerekli olacak enerji rezervini sağlamak amacıyla da genellikle metabolize edilebilir bir şeker olan fruktoz ilave edilmektedir (Maxwell ve Salamon 1993; Gil ve ark. 2003). Diğer taraftan, spermanın sıcaklığının 37 °C'den 5 °C'ye düşürülerek soğutulması sırasında oluşan soğuk şokunun membran yapısı ve geçirgenliği üzerindeki olumsuz etkilerini en az düzeye indirmek amacıyla hazırlanan tris temelli sulandırıcılara yaygın olarak %15–20 oranında yumurta sarısı katılması tavsiye edilmektedir (Swelum ve ark. 2022; Sönmez 2022). Buna ilaveten, spermanın dondurma ve çözdürme işlemleri sırasında ortaya çıkan bu ani sıcaklık değişikliklerine karşı spermatozoayı korumak amacıyla kriyoprotektan bir madde olan gliserol de %5-7 oranında hazırlanan sperma sulandırıcılarına ilave edilmektedir (Salamon ve Maxwell 2000; Mehta ve ark. 2020). Bununla birlikte, tris temelli sperma sulandırıcıların hazırlanmasında kullanılan bu kimyasal maddelerin kimyasal formüleri aynı olmakla birlikte aynı şirket tarafından farklı üretim teknolojilerine göre değişebilen saflık-homojenite düzeylerinde üretilmektedir (Tablo 1). Yapılan çalışmamızda, iki farklı üretim teknoloji ile üretilmiş kimyasal maddeler kullanılarak aynı oranlarda hazırlanan tris temelli sperma sulandırıcılarıyla sulandırılan koç spermalarının bireysel olarak dondurulup çözdürmesi sonrası total motilite, progresif motilite oranları ile spermatozoa hız oranları ve kinematik parametre değerleri yönünden istatistiki olarak önemli bir farklılık oluşmadığı ($p>0,05$) tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre; koç spermasının dondurulması amacıyla hazırlanan sperma sulandırıcılarında standart teknoloji ile üretilmiş kimyasal maddelerin kullanılmasının izotonik bir ortam oluşturulması ve pH dengesinin sağlanması açısından yeterli olduğu, diğer taraftan standart teknoloji yerine daha hassas teknoloji ile ultra saflıkta üretilmiş kimyasal maddelerin tercih edilmesinin ise toksitite düzeyi ve hassasiyet açısından önemli bir avantaj sağlamadığı söylenebilir. Bu sonuç, sperma sulandırıcıları hazırlanırken kullanılan kimyasal maddelerin ultra saflıkta üretilmiş daha pahalı serileri yerine aynı formüle sahip daha ekonomik standart üretimlerinin kullanılabileceğini göstermiştir.

Spermanın dondurulmasının amacı, spermanın sıcaklığının spermatozoonlara zarar vermeden kademeli olarak 5°C'den -196 °C'ye düşürmesidir. Spermanın dondurulması aşamasında kullanılacak dondurma hızı, çözdürme sonrası elde edilecek total ve progresif motilite oranları açısından tatmin edici değerlerin elde edilmesini etkileyen önemli bir faktördür (Byrne ve ark. 2000). Spermatozoonların biyokimyasal yapısı oldukça karışık ve sabit olmayan bir özellik taşır. Spermatozoon plazma membranının düzenli bir fonksiyon göstermesi açısından membran yapısındaki lipid ve protein bileşikleri arasında sıkı bir ilişki vardır. Spermatozoonların dondurulması, membran lipid katmanının iki tabakası arasındaki fosfolipit dağılımında değişikliğe yol açar. Membranda meydana gelen bu değişiklikler, belirli düzeyde membran yapısının bozulmasına neden olarak çözdürme sonrası spermatozoonların motilitesini ve fertilizasyon kabiliyetini sınırlayabilir (Parks ve Graham 1992; Hinkovska-Galcheva ve ark. 1998; Diaz ve ark. 2016). Bu açıdan, spermanın dondurulması sırasında özellikle 0 °C ile –20 °C arasındaki sıcaklıklar derecelerinin geçilme süreci oldukça önemli olup oldukça kritik bir aşama olarak değerlendirilir. Spermanın sıcaklığı -10 °C'ye yaklaştığında hücre içi su donar ve spermatozoonlar buz kristalleri oluşma riskiyle karşı karşıya bırakır. Diğer bir ifadeyle, bu aşamada çok hızlı bir soğutma yöntemi uygulandığında artan hücre içi buz kristallerinin oluşumu hücrelerin ölümü ile sonuçlanır (Salamon ve Maxwell 2000).

Nur ve ark. (2011), koç spermasının dondurulması için 5°C ile -20°C arasındaki sıcaklık geçişi sırasında hızlı (6°C/dak) ve yavaş (0,5°C/dak) dondurma hızı yöntemi uyguladıkları çalışmalarında, koç spermasının yavaş soğutma yöntemi ile dondurmasının hızlı dondurma yöntemine göre çözdürme sonrası motilite değerlerini olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Vichas ve ark. (2018) ise, 5°C ile -8°C arasında hızlı (5°C/dak) ve yavaş (3°C/dak) dondurma hızı uyguladıkları çalışmalarında koç spermasında yavaş soğutma prosedürü ile dondurmasının hızlı dondurma yöntemine göre çözdürme sonrası daha iyi motilite sonuçları sağladığını bildirmişlerdir. Yürütülen çalışmamızda da, koç spermasının dondurulması aşamasında uygulanan yavaş dondurma yönteminin

hızlı dondurma yöntemine göre çözdürme sonrası total motilite, progresif motilite ve hızlı hareket eden (rapid) spermatozoon oranın da önemli derecede bir artış ($p<0,05$), hareketsiz (statik) spermatozoon oranında ise önemli derecede bir azalma sağladığı ($p<0,05$) belirlenmiştir. Bu sonuç yukarıdaki çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Byrne ve ark. (2000) dondurma işlemi sırasında koç spermatozoasında en fazla hasarın -10°C ile -25°C arasında meydana geldiğini ve yavaş dondurmaya eşlik eden hücre dehidrasyon sürecinin hücrenin hayatta kalması için potansiyel olarak daha faydalı olacağını, buna karşın hızlı dondurma oranlarının hücre ölümüne neden olma olasılığının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, araştırmacılar bu kritik sıcaklık derecelerini geçişte hızlı (5°C/dak) ve yavaş (0,5°C/dak) dondurma hızı uyguladıkları çalışmalarında çözülme sonrası spermatolojik özellikler açısından iki dondurma yöntemi arasında önemli bir farklılığın olmadığını bildirmişlerdir. Nitekim, Pontbriand ve ark. (1989) da koç spermatozoonlarının dondurulurken kullanılacak soğutma hızı açısından dakikada 6 ile 24 °C arasındaki sıcaklık değişimlerine dayanabildiğini, bu nedenle koç spermasının dondurulması sırasında geniş bir soğuma hızı aralığının kullanılabileceğini bildirmiştir. Genel olarak kabul edilen teoriye göre, en iyi dondurma hızı, suyun spermatozoonları terk etmesine izin verecek kadar yavaş olmalıdır. Bu durum, dondurma sırasında hücre içi su kristalleşmesini önler. Bununla birlikte, yavaş bir soğutma hızının uygulanması spermatozoonların uzun bir süre boyunca yüksek çözünen madde konsantrasyonlarına maruz kalmasına ve hücre dehidrasyonuna neden olabilir. Bu yüzden, soğutma hızı açısından uygulanan dondurma hızı protokollerinden hangisinin yeterince yavaş veya hangisinin yeterince hızlı olduğunu rakamlarla kategorize etmek basit bir iş olmayıp türlere ve bireylere göre önemli değişiklikler gösterebilir (Saha ve ark. 2022).

Rickard ve ark.'ları (2016) yaptıkları çalışmada, koç spermatozoonlarının donma direncindeki tolerans düzeyinin, dondurma öncesi sperma kalitesinden bağımsız olarak bireyler arasında değişkenlik gösterebileceğini bildirmişlerdir. Yürütülen araştırmamızda da, oluşturulan dört gruptan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; çözdürme sonrası total motilite, progresif motilite, hızlı hareket eden ve hareketsiz (statik) spermatozoon oranları yönünden koçlar arasında bireysel olarak önemli farklılıkların olduğu ($p<0,05$) göze çarpmaktadır.

SONUÇ

Sonuç olarak, koç spermasının dondurulması aşamasında özellikle 5°C ile -20°C arasındaki sıcaklık geçişi sırasında yavaş dondurma (1°C/dak) yöntemi kullanılması; hızlı dondurma (5°C/dak) yöntemine göre çözdürme sonrası motilite oranları yönünden daha başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Diğer taraftan, koç spermasının dondurulması amacıyla sperma sulandırıcıları hazırlanırken ultra saflıkta üretilmiş kimyasal maddelerin ya da aynı formüle sahip standart üretimlerinin kullanılmasının çözdürme sonrası sperma kalitesini yönünden önemli bir farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmanın sonuçları, koçlar arasında dondurulup çözdürülme işlemine karşı bireysel tolerans düzeylerinin önemli değişkenlik gösterdiğini ve bu durumun çözdürme sonrası sperma kalitesinde bireysel olarak önemli farklılıklar oluşturduğunu da göstermektedir.

Çıkar çatışması: Yazarların rapor edecekleri herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Yazar Katkıları: MS ve ABB çalışmayı planlayıp projelendirme aşamalarını gerçekleştirdi. Deneysel aşamaları ABB, İHG, AÇC ve TCA gerçekleştirdi. İlk makale halini İHG yazdı. MS makaleyi okuyarak düzenledi.

Etik Onay: Bu çalışma 16.11.2022 tarihli 2022/18-09 oturum sayılı Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından etik kurul belgesi almaya gerek yoktur kararıyla onaylanmıştır.

Teşekkür

Yürütülen araştırma, TÜBİTAK–2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri kapsamında 15.03.2023 tarihinde kabul edilen 1919B012219953 no'lu proje ile desteklenmiş olup çalışma sırasında kullanılan sarf malzemelerin bir bölümü bu proje desteği ile finanse edilmiştir.

KAYNAKLAR

Bearden, H.J., Fuquay, J.W., Willard, S.T. (2004). Applied animal reproduction. 6th ed. New Jersey: Pearson Prentice Hallm.

Byrne, G.P., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, J.P., Boland, M.P. (2000). Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. Anim Reprod Sci., 62, 265–275. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00121-4

Díaz, R., Torres, M.A., Bravo, S., Sanchez, R., Sepúlveda, N. (2016). Determination of fatty acid profile in ram spermatozoa and seminal plasma. Andrologia 48, 723-726. https://doi.org/10.1111/and.12506

Gil, J., Lundeheim, N., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. (2003). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology 59, 1241-1255. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01177-9

Güngör, İ.H., Dayan Cinkara, S., Acısu, T.C., Arkalı, G., Koca, R.H., Akarsu, S.A., Can, C., Özer Kaya, Ş., Kızıl, M., Çakır, A., Fırat, F., Halıcı, S.M., Yılmaz, İ., Badıllı, N., Yüce, A., Gür, S., Sönmez, M., Türk, G. (2022). Effect of hydrated carbon 60 fullerene on frozen ram semen quality. Biopreserv. Biobank., 20(4), 340-347. https://doi.org/10.1089/bio.2021.0001

Hafez, B., Hafez, E. (2000). Reproduction in farm animals. 7th ed. Kiawah Island, South Carolina, USA: Copyright ©

Lippincott Williams & Wilkins. https://doi.org/10.1002/9781119265306

Hinkovska-Galcheva, V., Peeva, D., Momchilova-Pankova, A., Petkova, D., Koumanov, K. (1998). Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine derivatives, membrane fluidity and changes in the lipolytic activity of ram spermatozoa plasma membranes during cryoconservation. Int J Biochem., 20, 867-871. https://doi.org/10.1016/0020-711x(88)90076-6

İnanç, M.E., Güngör, Ş., Ata, A. (2017). Spermatozoa motilitesinin değerlendirilmesinde bilgisayar destekli sperm analiz sisteminin kullanımı. Turkiye Klin J Reprod Artif Insemin Special Topics., 3, 73-78.

Kulíková, B., Baláži, A., Tóthová, J., Jurˇcík, R., Huba, J., Chrenek, P. (2018). Dilution factor affects the ability of ram sperm to survive Cryopreservation: Short communication. Slovak J. Anim. Sci., 51, 41–44.

Layek, S.S., Kumaresan, A., Gorani, S., Elango, K., Karuppanasamy, K., Kishore, G., Gupta, O. (2022). Recent developments in bovine semen cryopreservation. Current Concepts in Bovine Reproduction, 223–242. https://doi.org/10.1007/978-981-19-0116-4_12

Maxwell, W.M.C., Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. Reprod. Fertil. Dev., 5, 613-638. https://doi.org/10.1071/RD9930613

Mehta, V., Pareek, P.K., Kumar, A., Purohit, G.N. (2020). Comparative effect of different concentrations of glycerol and ethylene glycol and temperature on cryopreservation of ram semen. Research Journal of Veterinary Practitioners, 8(3), 37-41. https://10.17582/journal.rjvp/2020/8.3.37.41

Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Tutuncu, S., Sagirkaya, H., Ozguden, C.G., Gunay, U., Dogan, I. (2011). Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 58: 267–272. https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002486

Ozer Kaya, Ş., Gungor, İ.H., Dayan Cinkara, S., Acisu, T.C., Koca, R.H., Akarsu, S.A., Can, C., Çakir, A., Yilmaz, İ., Halici, M.S., Gur, S., Sonmez, M., Turk, G. (2021). Effect of different doses of hydrated C60 fullerene nanoparticles on ram semen during cool-storage. Turk J Vet Anim Sci, 45(1), 139-147. https://10.3906/vet-2006-29

Parks, J.E, Graham, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology, 38, 209-222. https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F

Pontbriand, D., Howard, J., Schiewe, M.C., Syuart, L.D., Wildt, D.E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology, 26, 341-354. https://doi.org/10.1016/0011-2240(89)90058-8

Rickard JP, Schmidt RE, Maddison JW, Bathgate R, Lynch GW, Druart X, De Graaf SP. (2016) Variation in seminal plasma alters the ability of ram spermatozoa to survive cryopreservation. Reprod. Fertil. Dev. 28: 516–523. https://doi.org/10.1016/0011-2240(89)90058-8

Saha, M.A., Asaduzzaman, M., Bari, F.Y. (2022). Cryopreservation techniques for ram sperm. Vet Med Int., 1-16, e7378379. https://doi.org/10.1155/2022/7378379

Salamon, S., Maxwell, W.M. (2000). Storage of ram semen. Anim Reprod Sci., 62, 77-111. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X

Sönmez, M., Fırat, F. (2022). Bilgisayar destekli sperma analiz (CASA) sistemiyle yapılan incelemelerde spermatozoonların motilitesini ve kinematik değerlerini etkileyen faktörler. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 36 (2), 153-164.

Sönmez, M. (2022). Veteriner hekimlikte reprodüksiyon, suni tohumlama ve androloji ders notları. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Elazığ.

Swelum, A.A., HA Ba-Awadh, H., Olarinre, I., Saadeldin, I.M., Alowaimer, A. (2022). Effects of adding mixed chicken and quail egg yolks to the cryodiluent on the quality of ram semen before and after cryopreservation. Front Vet Sci., 1544, 1-13. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1013533

Ustuner, B., Alcay, S., Nur, Z., Sagirkaya, H., Soylu, M.K. (2014). Effect of egg yolk and soybean lecithin on tris-based extender in post-thaw ram semen quality and in vitro fertility. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 20, 393-398. https://doi.org/10.9775/ kvfd.2013.10248

Vichas, L., Tsakmakidis, I.A., Vafiadis, D., Tsousis, G., Malama, E., Boscos, C.M. (2018). The effect of antioxidant agents' addition and freezing method on quality parameters of frozen thawed ram semen. Cell Tissue Bank. 19; 113–121. https://doi.org/10.1007/s10561-017-9633-6

Vozaf, J., Makarevich, A.V., Balazi, A., Vasicek, J., Svoradova, A., Olexikova, L., Chrenek, P. (2021). Cryopreservation of ram semen: Manual versus programmable freezing and different lengths of equilibration. Anim. Sci. J., 92, e1-9, 13670. https://doi.org/10.1111/asj.13670

Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reprod Sci., 60, 481–492. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3

Yánez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J.E., Miró, J., Yeste, M. (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. Anim. Reprod. Sci., 246, 106904. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904

Zamiri, M.J. (2020). Update on semen cryopreservation in sheep and goats: A review. J. Livest. Sci. Technol., 8, 1–15. https://doi.org/10.22103/JLST.2020.15927.1321

Zhang, L., Wang, X., Jiang, C., Sohail, T., Sun, Y., Sun, X., Wang, J., L, Y. (2024). Effects of Different Diluents and Freezing Methods on Cryopreservation of Hu Ram Semen. Vet. Sci. 2024, 11, 251. https://doi.org/10.3390/vetsci11060251