

Epididimal boğa spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların etkisi

Eser AKAL^{*}, Murat SELÇUK^{**}, Emre DEMİRCİ^{***}

Öz: Bu çalışmanın amacı, üç farklı sulandırıcı ile sulandırılarak dondurulan epididimal boğa sperması üzerine sulandırıcı etkilerinin araştırılmasıdır. Spermalar 9 adet Holstein boğa testisinden (12-24 aylık) elde edildi ve TRIS-fruktoz-sitrik asit-gliserol (TYS) (%7 v/v) – yumurta sarısı (%20 v/v) sulandırıcısı, soya özlü bir ticari sulandırıcı olan Andromed® (Minitube, Germany) ve hayvansal protein içermeyen ticari bir sulandırıcı olan OPTIXcell® (Imv, L'Aîgle, France), ile sulandırıldı. Spermalar, 80 milyon spermatozoa/mL'lik son konsantrasyon olacak şekilde sulandırıldıktan sonra 0,25 mL'lik payetlere dolduruldu ve 4 saat boyunca ekilibrasyona tabi tutuldu. Ardından sıvı azot buharında donduruldu. Spermatolojik özellikler [motilite (%), canlı spermatozoa (%), anormal spermatozoa (%), HOST (+) spermatozoa (%)] taze, soğutulmuş ve dondurulmuş spermada değerlendirildi. Araştırmada farklı sulandırıcılarda yapılan spermatolojik muayenelerin istatistik değerlendirmesinde, motilite sonuçlarında gruplar arasında dondurulmuş spermada farklılık önemsizken, taze (P<0,001) ve soğutulmuş spermada (P<0,01) farklar önemli bulunmuştur. Canlı spermatozoa bulgularında gruplar arası farklar önemlidir (P<0,001). Anormal spermatozoa bulgularında kuyruk kısmına bağlı anomalilerde gruplar arasında taze spermada ve soğutulmuş spermada farkların önemli olduğu gözlenmiştir (P<0,05). HOST (+) sonuçlarında gruplar arası farklar önemli bulunmuştur (P<0,01). OPTIXcell® sulandırıcısı ile diğer sulandırıcılara göre daha olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu veriler ışığında, hayvansal protein içermeyen OPTIXcell® sulandırıcısının TYS ve Andromed® sulandırıcılarına göre, epididimal

* Yrd. Doç. Dr, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

** Doç. Dr, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

*** Doktora Öğrencisi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

boğa spermasının dondurulmasında daha uygun olduğu düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Boğa, epididimal sperma, sulandırıcılar.

The effect of different extenders on freezing epididymal bull spermatozoa

Abstract: The aim of present study was to compare the characteristics of frozen-thawed epididymal bull semen processed with three different cryopreservation media. Semen (n=9) were collected from 9 Holstein bull testes (aged 12-24 months) and semen processed using one-step dilution with a TRIS-fructose-citric acid-glycerol (7 % v/v)-(TFEY) egg yolk (20 % v/v) extender, Andromed® (Minitube, Germany) a soy extract diluents commercial brand and with OPTIXcell® (imv, L'Aîgle, France), a commercially available animal protein-free medium. Semen extended to a final dilution of 80 million spermatozoa/mL was packaged in 0.25 mL straws and equilibrated for 4 h, then frozen in liquid nitrogen vapour. Sperm characteristics [motility(%), viability (%), abnormal spermatozoa (%), HOST (+) spermatozoa (%)] were assessed on fresh, extended and cryopreserved semen. In the statistical evaluation of spermatological examinations performed in different diluents, differences in frozen sperm were not significant among the groups in the motility

results, but differences in fresh (P <0.001) and chilled sperm (P <0.01) were significant. Viability results were found to be important for each group (P <0.001). Differences in fresh sperm and chilled sperm were found to be significant (P <0.05) among the groups in the anomalies connected to the tail part in the abnormal spermatozoa results. The differences between the groups in the HOST (+) results were found to be significant for each group (P <0.01). With OPTIXcell® extender, more favourable results were obtained compared to other extenders. In conclusion, the animal proteinfree medium OPTIXcell® is well suited for cryopreservation of epididymal bull sperm according to TFEY and Andromed®.

Keywords: Bull, epididymal sperm, extenders.

Giriş

Evcil hayvanlarda epididimal spermanın dondurulması için etkili yöntemlerin geliştirilmesine artan ilgi, büyük oranda yüksek verim özelliklerine sahip bireylerdeki genetik materyalin korunması ve hastalık - ani ölüm sebebiyle nesli tükenmekle tehdit altında olan ırkların varlığından kaynaklanmaktadır (2, 7). Epididimal spermanın dondurulması, süresiz depolama özelliğinden dolayı genetik materyalin verimli ve ekonomik bir şekilde kullanımını sağlamaktadır (19).

Boğa epididimal spermasının in vivo dölveriminin ejaküle spermaya kıyasla daha düşük olduğu bilinmektedir. Ejaküle sperma, plazma membranına bağlanan protein türleri içermesi ve onların hareket özellikleri de dâhil olmak üzere birçok faktörden kaynaklı olarak epididimal spermadan farklıdır (10, 17). Bunun yanı sıra epididimal spermatozoonlar, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi çeşitli antioksidan enzimler tarafından fizyolojik olarak korunmaktadır (35). Yapılan bir araştırmada elde edilen sonuçlar hem ejaküle spermatozoonun hem de dondurulup çözdürülmüş epididimal spermatozoonun, sığır embriyolarının in vitro üretiminde kullanılması için eşit derecede uygun olduğunu göstermektedir (1).

Sperma dondurma ve çözdürme işlemi termal ve ozmotik şokaya olarak spermatozoon motilitesiyle birlikte enerji üretimini azaltır. Bununla beraber hücre zarı geçirgenliğinde bir artış olur (11). Spermatozoon membranının seçici geçirgenliğindeki bir değişiklik, spermatozoon motilitesini ve enerji üretimini azaltır, membran lipid kompozisyonunu değiştirir (13).

Boğa spermasının dondurulmasında yumurta sarısı içeren sulandırıcılar dünya çapında başarıyla kullanılmaktadır (14). Yumurta sarısı, soğutma ve dondurma

sırasında spermatozoayı koruyabilen fosfolipidleri, esasen fosfatidilkolini içeren bir düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) fraksiyonu içerir ve bu sayede koruma sağlar (3). Spermadaki bakteri miktarının artmasının spermatozoa üzerine zararlı etkileri bulunmaktadır. Yumurta sarısı ve süt gibi hayvansal ürünler mikrobiyel kontaminasyon riskini artırmaktadır. Bu sebeple endotoksin oluşumuyla spermatozoonun fertilité kapasitesi olumsuz yönde etkilenmektedir (4). Bu durumun önüne geçmek amacıyla araştırmacılar, sulandırıcılara hayvansal orijine dayanmayan apatojen ürünler veya SPF (specific pathogen free) yumurta sarısının katılmasının daha güvenli olduğunu savunmaktadırlar (4, 33).

Birçok hazır sulandırıcı veya formüle edilmiş kimyasal kompozisyonlar boğa spermasının dondurulması amacıyla kullanılabilir (34). Bununla birlikte, bir türün spermasının dondurulması için optimize edilmiş bir sperma dondurma protokolü, diğer bir tür için ideal olmayabilir. Farklı türlerden elde edilen spermatozoonlar, dondurmayı etkileyen büyüklük, şekil ve lipid kompozisyonu çeşitliliği gösterir. Epididimisten elde edilen boğa spermasının dondurulmasında spesifik bir sulandırıcı veya protokol yoktur (25). Bu nedenle bu çalışma, epididimal boğa sperması dondurulmasında, formüle edilmiş Tris-

sitrik asit-fruktoz sulandırıcısı ile iki ticari sulandırıcının (Andromed® ve OPTIXcell®) bazı spermatolojik parametreler üzerine etkisini araştırmak amacı ile tasarlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Özel bir mezbahadan kesim sonrası alınan 9 adet (12-24 aylık) Holstein boğa testisi (tek taraflı) çalışmanın materyal bölümünü oluşturdu. Hayvanlarda kesim öncesinde genel muayene açısından bir sorun gözlenmedi.

Testislerin alınması ve laboratuvara getirilmesi: Mezbahada kesilen boğaların testisleri kesimin hemen sonrasında scrotumunun bir bıçak yardımıyla kesilip açılması ile dışarı çıkarıldıktan sonra spermatik kord'dan kesilerek epididimislerle birlikte alındı. Alınan testisler, içerisinde +4°C'yi sağlayacak buz kalıpları bulunan kapalı bir kaba konularak kesimden sonraki 30 dakika içinde laboratuvara ulaştırıldı ve bunu takiben en geç 4 saat içinde spermanın elde edilmesi ve işlenmesi tamamlandı (15).

Spermanın elde edilmesi ve işlenmesi: Laboratuvara getirilen testislerden epididimisler ayrıldı, steril bir bisturi yardımıyla cauda epididimis üzerine kesit atılarak, spermanın dışarı çıkması sağlandı. Daha sonra dışarı sızan sperma steril bir enjektör yardımıyla çekilerek toplandı (24). Her testisten elde edilen sperma her bir

sulandırıcı için ayrı ayrı eklenmek üzere üçe ayrıldı. Grup I; TYS sulandırıcısı (1) (Tris: 3,605 g, Sitrik Asit: 2,024 g, Fruktoz: 1,488 g, Yumurta Sarısı: 20 ml, Gliserol: 7 ml, Penicillin: 1000 IU/ml, Streptomycin: 1000 microgram/ml, Distile su: 100 ml'ye tamamlanır. pH: 7,00), Grup II; Andromed® (pH: 7,00) ve Grup III OPTIXcell® (pH: 6,91) ile sulandırıldı. Her grup spermatolojik muayeneler yönünden *taze* (ilk elde edilen), *soğutulmuş* (dondurma öncesi +5°C'de 4 saat ekilibrasyona tabi tutulan) ve *dondurulmuş* (sıvı azot buharında dondurulup çözdürülen) olarak incelendi.

Sulandırılan epididimal spermalar son konsantrasyonları 80×10^6 sp/ml olacak şekilde ayarlandıktan sonra manuel olarak 0,25 ml'lik payetlere çekildi. Ardından payetler içerisindeki spermalar +5°C'de 4 saat ekilibrasyona tabii tutuldu ve 6 cm sıvı azot buharında (-80°C ila -120°C'de) 20dk. bekletilerek donduruldu (22). Dondurulan spermalar en az 24 saat sıvı azotta (-196°C) saklandıktan sonra 37°C'deki kuru sistem sperma çözdürme cihazında 25-30 saniye bekletilerek çözdürüldü (28) ve ardından spermatolojik parametreler yönünden tekrar incelendi.

Spermatolojik muayeneler: Spermatolojik muayenelerden spermatozoa progresif

motilitesi (%), spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^6$ sp/ml), ölü/canlı spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (%) ve HOST (+) oranı saptandı.

Progresif motilite muayenesi: Muayene ısıtma tablalı, faz-kontrast mikroskop kullanılarak yapıldı ve yüzde olarak belirlendi. Spermadan küçük bir damla alınarak ısıtma tablalı ve sıcaklığı 37°C 'ye ayarlanmış mikroskoba konulan lam üzerine konuldu, lamel ile kapatılıp 40X büyütmede spermatozoonların hareketlerinin incelenmesi yapıldı. Böylece bir yönde güçlü hareket eden spermatozoonların hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösterenlere oranı en az birbirinden farklı üç mikroskop alanında sayılması ile ortalaması alınarak yüzde olarak saptandı (29).

Spermatozoa yoğunluğu: Elde edilen epididimal spermadaki birim hacim spermada bulunan spermatozoa sayısı hemositometrik yöntem ile saptandı. Sperma, 1/500 oranında Hayem solüsyonuyla sulandırıldı ve Thoma lamlarda sayılarak, özel formülünde bulunan rakamlar yerine konularak spermatozoa yoğunluğu belirlendi (32).

Ölü/canlı spermatozoa oranı (%): Boyama yöntemiyle (% 2'lik Eosin) ölü/canlı spermatozoa oranları yüzde olarak

belirlendi. Bu işlem 37°C 'de, % 2'lik Eosin boya ile yapıldı. Bir damla sperma, iki damla Eosin ile karıştırılıp bir lam üzerine froti çekildi. 15 saniye boyunca kurumaya bırakılan slaytlar mikroskopta 40X büyütme ile 400 spermatozoon sayılarak, boya alan (ölü hücrelerin) spermatozoonların sayısı yüzde olarak belirlendi (32).

Anormal spermatozoa oranı (%): Anormal spermatozoa oranının belirlenmesinde sıvı fikzasyon yöntemi kullanıldı. Baş-akrozom, orta kısım, kuyruk anomalileri ve toplam spermatozoa anomalileri oranı yüzde olarak belirlendi. Spermatozoa, Hancock solüsyonu içerisinde fikse edildi ve hazırlanan bu solüsyondan bir damla lam üzerine konulup lamel kapatıldı. Kapatılan lamel üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılarak 100X büyütmede 400 spermatozoon sayılarak morfolojileri yüzde olarak tespit edildi (32).

Hipo-ozmotik şişme testi (HOST) oranı (%): Spermatozoon membranının fonksiyonel bütünlüğünü belirlemek için 100 mosm/lt'lik bir solüsyon (9 g fruktoz + 4,9 g sodyum sitrat, 1 lt distile su içerisinde çözüldü) kullanıldı. 30 µl sperma örneği 300 µl 100 mOsm hipo-ozmotik solüsyonu içerisinde 37°C 'de 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldıktan

sonra, bu karışımdan 0,2 ml örnek ısıtma tablalı mikroskopta 100X büyütmede 200 spermatozoon değerlendirildi. Şişmiş veya kıvrılmış kuyruklar kaydedildi (27).

İstatistik analiz: Spermatolojik özelliklerden anormal sperma oranları, interaksiyon etkilerinin araştırılması amacıyla iki yönlü (two-way) varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Motilite, ölü-canlı spermatozoa oranı ve hipozmotik şişme oranı yine benzer yaklaşımla analiz edilerek değerlendirilmiştir. Tüm veriler ortalama ve standart sapma şeklinde özetlenerek sunulmuştur. İstatistik analizler ve tanıtıcı istatistiklerde SAS (ver. 3.01 - 2009) istatistik paket programı kullanıldı (5).

Bulgular

Araştırma süresince boğalardan elde edilen taze, soğutulmuş ve dondurulmuş epididimal spermadaki spermatozoa motilitesi (Tablo 1), canlı spermatozoa (Tablo 2), anormal spermatozoa oranları (Tablo 3) ve HOST (+)'e (Tablo 4) ait ortalama değerler ve bu değerlere ilişkin analizler ilgili tablolarda verilmiştir.

Araştırmada farklı sulandırıcılarda yapılan spermatolojik muayenelerin istatistik değerlendirmesinde, motilite sonuçlarında gruplar arasında dondurulmuş spermada farklılık önemsizken, taze spermada ($P<0,001$) ve soğutulmuş spermada ($P<0,01$)

farklar önemli bulunmuştur. Yine motilite sonuçlarında uygulamalar arasında her grup için farklar önemlidir ($P<0,05$). Canlı spermatozoa bulgularında gruplar arası ve uygulamalar arası farklar her grup ve uygulama için önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0,001$). Anormal spermatozoa bulgularında baş-akrozom ve orta kısma ait farklılık önemsizken, kuyruk kısmına bağlı anomalilerde gruplar arasında taze spermada ve soğutulmuş spermada farkların önemli olduğu gözlenmiştir ($P<0,05$). Ayrıca uygulamalar arası farklılık her uygulamada önemli bulunmuştur ($P<0,001$). HOST (+) sonuçlarında gruplar arası farklar ($P<0,01$) ve uygulamalar arası farklar ($P<0,001$) önemli bulunmuştur.

Tablo 1: Motilite Bulguları (%).**Table 1:** Motility results (%).

	Taze sperma	Soğutulmuş sperma	Dondurulmuş sperma	P
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	
Grup I	47,77 ± 4,00 ^{aB}	36,66 ± 3,72 ^{bB}	28,88 ± 3,51 ^b	*
Grup II	57,77 ± 3,91 ^{aAB}	43,88 ± 4,39 ^{bAB}	30,55 ± 3,05 ^c	*
Grup III	67,77 ± 3,64 ^{aA}	51,66 ± 4,78 ^{bA}	37,77 ± 3,34 ^c	*
P	***	**	Ö.S.	

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, Ö.S. Önemsiz ($P > 0,05$)

A, B, C: Gruplar arasında aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalamalar önemli derecede farklıdır.

a, b, c: Uygulamalar arasında aynı satırda farklı harfle ifade edilen ortalamalar önemli derecede farklıdır.

Ö.S.: Non-significant ($P > 0,05$)

A, B, C: The averages expressed in different letters in the same column between the groups are significantly different.

a, b, c: The averages expressed in different letters on the same line between treatments are significantly different.

Tablo 2: Canlı spermatozoa bulguları (%).**Table 2:** Live spermatozoa results (%).

	Taze sperma	Soğutulmuş sperma	Dondurulmuş sperma	P
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	
Grup I	63,22 ± 1,60 ^{aC}	50,22 ± 1,66 ^{bC}	40,22 ± 1,63 ^{cB}	***
Grup II	73,88 ± 1,46 ^{aB}	61,00 ± 1,62 ^{bB}	43,44 ± 1,65 ^{cB}	***
Grup III	85,77 ± 1,52 ^{aA}	70,33 ± 1,52 ^{bA}	52,88 ± 1,66 ^{cA}	***
P	***	***	***	

*** $P < 0,001$

A, B, C: Gruplar arasında aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalamalar önemli derecede farklıdır.

a, b, c: Uygulamalar arasında aynı satırda farklı harfle ifade edilen ortalamalar önemli derecede farklıdır.

A, B, C: The averages expressed in different letters in the same column between the groups are significantly different.

a, b, c: The averages expressed in different letters on the same line between treatments are significantly different.

Tablo 3: Anormal spermatozoa bulguları (%).**Table 3:** Abnormal spermatozoa results (%).

		Grup I	Grup II	Grup III	P
		$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	
Baş akrozom	Taze sperma	2,88 ± 0,56	2,66 ± 0,70	3,44 ± 0,44	Ö.S.
	Soğutulmuş sperma	3,00 ± 0,66	2,33 ± 0,64	3,44 ± 0,94	Ö.S.
	Dondurulmuş sperma	3,44 ± 0,64	3,33 ± 0,47	3,66 ± 0,55	Ö.S.
P	Ö.S.	Ö.S.	Ö.S.		
Orta kısım	Taze sperma	4,66 ± 1,11	3,66 ± 0,95	5,33 ± 0,70	Ö.S.
	Soğutulmuş sperma	4,00 ± 0,60	5,33 ± 1,54	5,55 ± 0,66	Ö.S.
	Dondurulmuş sperma	5,44 ± 0,95	6,66 ± 0,84	7,22 ± 0,36	Ö.S.
P	Ö.S.	Ö.S.	Ö.S.		
Kuyruk	Taze sperma	11,11 ± 1,79 ^{bAB}	18,22 ± 2,89 ^{aA}	17,55 ± 1,74 ^a	**
	Soğutulmuş sperma	10,00 ± 0,91 ^{bB}	13,11 ± 2,15 ^{abB}	15,88 ± 1,90 ^a	**
	Dondurulmuş sperma	13,33 ± 0,98 ^{bA}	14,22 ± 1,05 ^{bB}	19,22 ± 0,86 ^a	**
P	*	*	Ö.S.		

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, Ö.S. Önemsiz ($P > 0,05$)

A, B, C: Gruplar arasında aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalamalar önemli derecede farklıdır.

a, b, c: Uygulamalar arasında aynı satırda farklı harfle ifade edilen ortalamalar önemli derecede farklıdır.

Ö.S. : Non-significant ($P > 0,05$)

A, B, C: The averages expressed in different letters in the same column between the groups are significantly different.

a, b, c: The averages expressed in different letters on the same line between treatments are significantly different.

Tablo 4: HOST (+) sonuçları (%).**Table 4:** Results of the HOST (+) (%).

	Taze sperma	Soğutulmuş sperma	Dondurulmuş sperma	P
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	
Grup I	29,22 ± 1,51 ^{aB}	23,00 ± 1,40 ^{bB}	16,33 ± 1,23 ^{cC}	***
Grup II	34,55 ± 1,58 ^{aAB}	27,11 ± 1,48 ^{bB}	18,66 ± 1,29 ^{cB}	***
Grup III	39,33 ± 1,62 ^{aA}	29,33 ± 1,51 ^{bA}	22,11 ± 1,38 ^{cA}	***
P	**	**	**	

** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

A, B, C: Gruplar arasında aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalamalar önemli derecede farklıdır.

a, b, c: Uygulamalar arasında aynı satırda farklı harfle ifade edilen ortalamalar önemli derecede farklıdır.

A, B, C: The averages expressed in different letters in the same column between the groups are significantly different.

a, b, c: The averages expressed in different letters on the same line between treatments are significantly different.

Tartışma ve Sonuç

Sperma dondurulması amacıyla kullanılan ticari sulandırıcıların maliyetleri yüksek olarak algılansa da spermanın sulandırma işlemi sırasında sağladıkları kolaylıklar göz önüne alındığında avantajları açıkça ortaya çıkmaktadır. Sulandırıcının laboratuvar ortamında hazırlanma işleminde, kimyasalların tartılması ve ayarlanması gibi zorluklarının yanı sıra kontaminasyon riski oldukça fazladır. Ayrıca kimyasal maddelerin uygun şartlarda muhafaza edilme zorunlulukları yanında belli bir kullanım sürelerinin olması da bir başka olumsuzluktur.

Sperma dondurulmasındaki sonuçlar; çalışmada kullanılan sulandırıcılara, hayvan materyalinin farklı ırk ve yaşta olmasına, bakım besleme koşullarının farklılığına, sulandırıcılara katılan kryoprotektanların oranı ve farklılığına, spermanın dondurma şekli ve metoduna göre değişiklikler gösterebilmektedir (34).

Boğa spermasının dondurulması amacıyla, birden fazla kombinasyonu ile TYS sulandırıcısı (1, 16, 18) ve farklı ticari sulandırıcılar (8, 20, 22) günümüze kadar denenmiştir. Bu ticari sulandırıcılar içeriklerine göre (bitkisel içerikli, protein ve yumurta sarısı içermeyen gibi) farklılıklar göstermektedir.

Lopes ve ark. (18) epididimal boğa spermasını dondurdukları araştırmalarında TYS ve Andromed® ile taze spermada sırasıyla % 64,4 ± 7,3 ve % 40,6 ± 8,1 motilite değerleri elde ederken, bu değerler dondurma sonrası sırasıyla % 40,6 ± 8,5 ve % 20,0 ± 9,4 olarak bulunmuştur. Yine boğa epididimal spermasının denendiği bir çalışmada Fleisch ve ark., (9) başlangıçta % 85,1 ± 7,6 buldukları motilite oranını Andromed® ve OPTIXcell® ile sulandırarak dondurma öncesi sırasıyla % 73,4 ± 15,2 ve % 77,9 ± 10,3 olarak, dondurma sonrası sırasıyla % 42,1 ± 15,6 ve % 55,9 ± 12,7 olarak tespit etmişlerdir. Araştırmamızda bulduğumuz değerler Lopes ve ark., (18)'nin buldukları değerler ile yakınlık gösterirken, Fleisch ve ark., (9)'nin buldukları değerlerden daha düşük olduğu görülmüştür. Bu fark, kullanılan ön sulandırıcı ve dondurma metodunun farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Memeli sperması suyun donma noktasına yakın bir sıcaklığa doğru uygulanan soğutulmaya karşı çok hassastır. Soğuk şoku olarak bilinen bu durum spermatozoada çözündürme sonrası geri dönüşümsüz bir motilite kaybına neden olmaktadır. Soğuk şoku, metabolik fonksiyonlardaki değişiklikler, hücresel membrandaki hasarı ve

membran bileşenlerinin düzenlenmesindeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır (23).

Chaudhari ve ark.,(6) manda spermasında % 90,48 ± 0,19 oranında elde ettikleri canlı spermatozoa oranını, TYS ve OPTIXcell® ile sulandırarak dondurma öncesi sırasıyla % 79,21 ± 0,39 ve % 81,58 ± 0,38 bulurken bu değerler dondurma sonrası sırasıyla % 57,19 ± 0,79 ve % 59,67 ± 0,91 olarak kaydedilmiştir. Lopes ve ark., (18) ise Andromed® sulandırıcısını denedikleri epididimal boğa spermasında dondurma öncesi % 77,6 ± 7,5 olarak buldukları canlı spermatozoa oranını dondurma sonrası % 21,0 ± 10,40 olarak bulmuşlardır. Araştırmamızda elde ettiğimiz canlı spermatozoa değerleri, Lopes ve ark., (18)'nin buldukları değerler ile kısmi yakınlık ve yükseklik gösterirken, Chaudhari ve ark., (6)'nın buldukları değerlerden daha düşük olduğu görülmüştür. Bu farklılıklar, hayvan türü, kullanılan ön sulandırıcı ve dondurma metodunun farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Anormal spermatozoanın değerlendirildiği araştırmalarda Tuncer ve ark., (34) ejaküle boğa spermasında akrozom, baş, orta ve kuyruğa bağlı anomalileri için sırasıyla % 0,12 ± 0,05, % 1,05 ± 0,03 , % 0,85 ± 0,13 ve % 0,85 ± 0,13 olarak buldukları değerler Andromed® sulandırıcı ile sulandırıldıktan

sonra dondurma öncesi sırasıyla % 0,27 ± 0,07, % 1,67 ± 0,1, % 1,25 ± 0,11 ve % 2,57 ± 0,17, dondurma sonrası sırasıyla % 0,55 ± 0,09, % 2,53 ± 0,15, % 1,48 ± 0,14 ve % 3,70 ± 0,21 olarak bulunmuştur. Chaudhari ve ark. (6) manda spermasında başlangıçta baş kısma, orta kısma ve kuyruğa bağlı anomalileri sırasıyla % 1,83 ± 0,05, % 0,88 ± 0,03, % 3,44 ± 0,05 buldukları araştırmalarında, TYS ve OPTIXcell® ile sulandırarak dondurma öncesinde TYS ile bu parametreler için sırasıyla % 2,27 ± 0,08, % 1,23 ± 0,06, % 4,40 ± 0,07 değerleri, OPTIXcell® ile % 1,79 ± 0,08, % 1,08 ± 0,08, % 4,21 ± 0,11 değerleri, dondurma sonrasında ise TYS ile % 3,42 ± 0,09, % 2,08 ± 0,07, % 6,83 ± 0,10 OPTIXcell® ile % 3,02 ± 0,11, % 1,79 ± 0,07, % 6,46 ± 0,12 elde etmişlerdir. Bu değerlere ait verileri ile araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlar kısmi benzerlikler ve farklılıklar göstermiştir. Bu durumun epididimal sperma yerine ejaküle sperma tercih edilmesi ve hayvan türü farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Taşdemir ve ark., (31) boğa spermasında TYS sulandırıcısı ile çözüm sonu % 41,10 ± 0,40 oranında HOST (+) sonuç elde ederken, Andromed® sulandırıcı ile Rashedi ve ark.,(26) yine boğa spermasında yapılan bir araştırmalarında % 44,01 sonuç elde etmiştir.

Swami ve ark., (30) ise manda spermasında OPTIXcell® sulandırıcı ile % 32,15 ± 11,89 oranında HOST (+) sonuç elde etmişlerdir. Araştırmamızda bu sonuçlara kıyasla düşük sonuçlar elde edilmiştir. Bu farkın nedeni epididimal sperma yerine ejaküle sperma tercih edilmesi ve hayvan türü farklılığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Günümüze kadar kullanılan sulandırıcılarda yumurta sarısı yoğun olarak kullanılmakta ve içerdiği hormonlar ve kontaminasyon riskleri içermesi fertilite kapasitesini etkileyebilmektedir(12,21). Sonuç olarak ticari olarak satılan Andromed® ve OPTIXcell® sperma sulandırıcıları maliyetleri ile dikkati çekse bile, çeşitli kimyasallar ile laboratuvar ortamında hazırlanan diğer sulandırıcılara göre spermanın sulandırma ve dondurma işlemleri sırasında sağladıkları kolaylıklar ve özellikle hijyenik olmalarından dolayı tercih edilebilir durumdadırlar. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar dâhilinde dondurma-çözdürme sonrası OPTIXcell® sulandırıcısında spermatolojik parametre sonuçlarının istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendiğinden, Andromed® ve TYS sulandırıcılarına göre öncelikle tercih edilebileceği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. **Almeida F, Silva S, Souza H, Gomes W, Lima Filho J, Wicke A, Batista A, Guerra M** (2016): *Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis*. *Andrologia*: 1-9.
2. **Andrabi S, Maxwell W** (2007): *A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species*. *Animal Reproduction Science*, **99**(3): 223-243.
3. **Bergeron A, Manjunath P** (2006): *New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk*. *Molecular reproduction and development*, **73**(10): 1338-1344.
4. **Bousseau S, Brillard J, Marquant-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M** (1998): *Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents*. *Theriogenology*, **50**(5): 699-706.
5. **Breslow NE, Clayton DG** (1993): *Approximate inference in generalized linear mixed models*. *Journal of the American statistical Association*, **88**(421): 9-25.

6. **Chaudhari D, Dhami A, Hadiya K, Patel J** (2015): *Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196 C) of buffalo semen*. Veterinary world, **8**(2): 239.
7. **Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R** (2000): *Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species*. Reproduction Nutrition Development, **40**(5): 493-504.
8. **Fleisch A, Bollwein H, Witschi U, Siuda M, Janett F** (2015): *Effects of an extended equilibration period and different cryopreservation media on quality of bovine sperm*. Reproduction in Domestic Animals, **50**: 28.
9. **Fleisch A, Malama E, Witschi U, Leiding C, Siuda M, Janett F, Bollwein H** (2017): *Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen*. Theriogenology, **89**: 255-262.
10. **Goovaerts I, Hoflack G, Van Soom A, Dewulf J, Nichi M, de Kruif A, Bols P** (2006): *Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull*. Theriogenology, **66**(2): 323-330.
11. **Hammerstedt R, Graham JK, Nolan JP** (1990): *Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive*. J Androl, **11**(1): 73-88.
12. **Hartmann S, Lacorn M, Steinhart H** (1998): *Natural occurrence of steroid hormones in food*. Food chemistry, **62**(1): 7-20.
13. **He L, Bailey J, Buhr M** (2001): *Incorporating Lipids into Boar Sperm Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential 1*. Biology of reproduction, **64**(1): 69-79.
14. **Holt W** (2000): *Basic aspects of frozen storage of semen*. Animal reproduction science, **62**(1): 3-22.
15. **Lambrechts H, Van Niekerk F, Coetzer W, Cloete S, Van der Horst G** (1999): *The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (Syncerus caffer) spermatozoa*. Theriogenology, **52**(7): 1241-1249.
16. **Layek S, Mohanty T, Kumaresan A, Parks J** (2016): *Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders*. Animal Reproduction Science, **172**, 1-9.
17. **Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL** (1985): *Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro*. Gamete research, **12**(4): 345-355.

- 18. Lopes G, Soares L, Ferreira P, Rocha A** (2015): *Tris-egg yolk-glycerol (TEY) extender developed for freezing dog semen is a good option to cryopreserve bovine epididymal sperm cells*. *Reproduction in Domestic Animals*, **50**(1): 97-103.
- 19. Martins C, Rumpf R, Pereira D, Dode M** (2007): *Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production*. *Animal reproduction science*, **101**(3): 326-331.
- 20. Miguel-Jiménez S, Mogas T, Peña A, Tamargo C, Hidalgo C, Muiño R, Rodríguez-Gil J, Morató R** (2016): *Post-thaw changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of dairy bull semen using four different commercial extenders*. *Animal Reproduction*, **13**(3): 573-573.
- 21. Muller-Schlosser F, Aires V, Hirsch E, Hirsch K** (2001): *Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk free semen diluters for cryopreservation of bovine semen*. 34 th Conference on physiology and pathology of reproduction, Giessen.
- 22. Papa PM, Papa FO, Oliveira LA, Guasti PN, Castilho C, Giometti IC** (2015): *Different extenders in the cryopreservation of bovine epididymal spermatozoa*. *Animal reproduction science*, **161**: 58-63.
- 23. Parks JE** (1997): *Hypothermia and mammalian gametes*. In: Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*. San Diego: Academic Press: 229-262.
- 24. Patrizio P, Silber S, Ord T, Balmaceda J, Asch R** (1988): *Two births after microsurgical sperm aspiration in congenital absence of vas deferens*. *The Lancet*, **332**(8624): 1364.
- 25. Purdy P** (2006): *A review on goat sperm cryopreservation*. *Small Ruminant Research*, **63**(3): 215-225.
- 26. Rashedi M, Fazeli MH, Bahreini M** (2016): *Polymyxin B changes the plasma membrane integrity of cryopreserved bull semen*. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **5**(5): 411-415.
- 27. Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Eken A, Akay C** (2015): *Influence of fetuin and hyaluronan on the post-thaw quality and fertilizing ability of Holstein bull semen*. *Cryobiology*, **71**(1): 119-124.
- 28. Selçuk M, Akal E, Çelebi M** (2014): *In Vitro Evaluation of Frozen Bull Sperm Thawed in The Different Systems*. *Kocatepe Veterinary Journal*, **7**(1): 33-37.
- 29. Sharma M, Singh M, Kapoor S, Jasial S** (2012): *Inter relationship between some routine semen evaluation parameters in*

Jersey X local hill cattle crossbred bulls. Open veterinary journal, **2**(1): 26-31.

30. Swami DS, Kumar P, Malik R, Saini M, Kumar D, Jan M (2016): *Cysteamine supplementation revealed detrimental effect on cryosurvival of buffalo sperm based on computer-assisted semen analysis and oxidative parameters*. Animal Reproduction Science, **177**, 56-64.

31. Taşdemir U, Tuncer PB, Büyükleblebici S (2014): *Effects of various antioxidants on cryopreserved bull sperm quality*. Bull Sperm Quality, **1**, 2.

32. Tekin N (1994): *Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi*. Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Doğum ve İnfertilite. Dizgievi, Konya.

33. Thibier M, Guerin B (2000): *Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination*. Animal Reproduction Science, **62**(1): 233-251.

34. Tuncer PB, Çevik M, Demiral ÖO, Kinet H (2005): *Boğa spermalarının iki farklı sulandırıcı ile dondurulması ve in vitro değerlendirilmesi*. Erciyes Üniv Vet Fak Derg, **2**(2): 65-71.

35. Vernet P, Aitken R, Drevet J (2004): *Antioxidant strategies in the epididymis*. Molecular and cellular endocrinology, **216**(1): 31-39.

Geliş Tarihi: 6/3/2017 Kabul Tarihi: 7/4/2017

Yazışma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Eser AKAL

Ondokuz Mayıs Üniversitesi,

Veteriner Fakültesi,

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı,

55139, Atakum, Samsun

e-posta: eserakal@omu.edu.tr