

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA
(VETERİNER) ANABİLİM DALI

**MANDALARDAN POSTMORTEM ELDE EDİLEN
SPERMALARDA DONDURMANIN DNA HASARI VE BAZI
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Eser AKAL

**Samsun
Nisan - 2014**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA
(VETERİNER) ANABİLİM DALI

**MANDALARDAN POSTMORTEM ELDE EDİLEN
SPERMALARDA DONDURMANIN DNA HASARI VE BAZI
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Eser AKAL

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Murat SELÇUK

**Samsun
Nisan - 2014**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eser AKAL tarafından Yrd. Doç. Dr. Murat SELÇUK danışmanlığında hazırlanan
“MANDALARDAN POSTMORTEM ELDE EDİLEN SPERMALARDA
DONDURMANIN DNA HASARI VE BAZI SPERMATOLOJİK
PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından
18/04/2014 tarihinde yapılan sınav ile Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında
DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Muzaffer ÇELEBİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Necmettin TEKİN, Ankara Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Mesut ÇEVİK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Murat SELÇUK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

/ / 2014

Prof. Dr. Süleyman KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca tecrübe ve birikimlerinden faydalandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Murat SELÇUK başta olmak üzere, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Muzaffer ÇELEBİ'ye ve Anabilim Dalımız öğretim üyesi Doç. Dr. Mesut ÇEVİK'e, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e, mesai arkadaşım Arş. Gör. Alper KOÇYİĞİT'e, çalışmalarım esnasında hiçbir yardımı esirgemeyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Deniz YENİ'ye ve öğretim elemanı Dr. Fatih AVDATEK'e, materyal temini için yardımlarını esirgemeyen Samsun ili mezbaha çalışanlarına ve 19 Mayıs Belediye Mezbahası sorumlu Veteriner Hekimi Mahmut BİLGİN'e, moral, motivasyon yanında tecrübelerini esirgemeyen Doç. Dr. Zehra SELÇUK'a ve Doç. Dr. Mehmet KAYA'ya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi ve elemanlarına ve araştırmamıza (PYO. VET. 1904. 11. 001) sağladığı maddi destekten dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi'ne teşekkür ederim.

Ayrıca bugüne kadar maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve her zaman bana destek olan aileme şükranlarımı sunarım.

ÖZET

MANDALARDAN POSTMORTEM ELDE EDİLEN SPERMALARDA DONDURMANIN DNA HASARI VE BAZI SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ

Amaç: Yapılan bu çalışmanın amacı, mezbahanelerden kesim sonrası alınan manda testislerinden elde edilen epididimal spermalarda dondurmanın spermatozoon DNA hasarı ve bazı spermatolojik parametreler üzerine etkisinin incelenmesidir.

Materyal ve Metot: Samsun il ve ilçe mezbahanelerinden kesim sonrası alınan 50 adet erkek Anadolu mandası (3 yaş ve üzeri) testislerinde morfometrik ölçümler yapıldı. Elde edilen epididimal spermalarda yapılan spermatolojik muayenelerle spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^6$ sp/ml), spermatozoa progresif motilitesi (%), ölü/canlı spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (%) ve spermatozoon DNA hasarı saptandı.

Bulgular: Araştırmada taze sperma ile çözüm sonu sperma progresif motilitesi, ölü spermatozoa oranı, orta kısım anomalisi, kuyruk anomalisi ve toplam anomali oranları arasında önemli ($p < 0,001$) farklılıkların olduğu saptandı. Taze sperma ile çözüm sonu spermadaki DNA hasarı değerleri arasındaki farkın önemli ($p < 0,0001$) olduğu belirlendi. Araştırmada morfometrik testis ölçümlerinden cauda epididimis ağırlığı ile taze spermadaki progresif motilite korelasyon değeri önemli ($p < 0,05$) bulundu.

Sonuç: Elde edilen epididimal spermalarda taze ve çözüm sonrası progresif motilite oranları yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuş ve post-mortem elde edilen epididimal manda spermasının biyoteknolojik yöntemlerde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın, mandalarda döl verimini olumsuz etkileyecek spermatozoon DNA hasarının düzeyinin belirlenmesi ile ülkemizde manda popülasyonunun iyileştirilmesine ilişkin yapılacak araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Artan spermatozoon DNA hasarından döl veriminin ne derece etkilendiğinin belirlenmesi ve dondurulan-çözdürülen spermada spermatozoon DNA hasarını en az düzeye indirmek için daha kapsamlı araştırmalar yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Anadolu mandası; DNA hasarı; epididimal; sperma dondurma.

Eser AKAL, Doktora Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Nisan – 2014

ABSTRACT

EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON DNA DAMAGE AND VARIOUS SPERM PARAMETERS IN THE POST-MORTEM OBTAINED BUFFALO SPERM

Aim: The purpose of this study, investigation of the effects of freezing on DNA damage and some sperm parameters in epididymal sperm obtained from the buffalo testicles taken from slaughterhouses after slaughtering.

Material and Method: Morphometric testicular measurements were detected in 50 male Anatolian buffaloes (3 years old and above) testicles taken from Samsun provinces and districts slaughterhouses after slaughtering. Spermatological examination of the spermatozoa concentration ($\times 10^6$ sp/ml), sperm motility (%), live/dead spermatozoa rate (%), abnormal spermatozoa rate (%) were determined. Sperm DNA damage values were determined.

Results: In the study, differences between the fresh and thawed sperm motility, dead sperm, the central portion of anomalies, tail anomalies and total anomaly values were found statistically significant ($p < 0.001$). Differences between fresh and thawed sperm DNA damage values were also found statistically significant ($p < 0.0001$). Correlations value between caput epididymis weight and fresh motility was found statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusion: Because of determination compatible levels in fresh and thawed sperm motility rate, obtained post-mortem of buffalo semen that may be suitable for biotechnological methods has been concluded. It is thought to contribute to researches related to the improvement of buffalo populations in our country by determining of sperm DNA damage levels that have negative effects on fertility. More extensive researches will be useful for determining the effect of increased sperm DNA damage on fertility and minimizing the sperm DNA damage in frozen-thawed semen.

Keywords: Anatolian buffalo; DNA damage; epididymal; sperm cryopreservation.

Eser AKAL, PhD Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, April – 2014

SİMGELER ve KISALTMALAR

•OH	Hidroksil radikali
AO	Acridine orange
ATP	Adenozin trifosfat
BER	Base excision repair
CMA ₃	Chromomycin A ₃
Comet	Tek hücre jel elektroforezi
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPI	DNA parçalanma indeksi
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Uridintrifosfat
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immuno-sorbent assay
FISH	Fluorescein in situ hybridization
FSH	Folikül stimulan hormon
GSH	Glutasyon
GTLS	Gentamisin, tilosin ve Linco-spectin
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HOST	Hipoozmotik şişme testi
IU	International unit
IVF	İn vitro fertilizasyon
IVM	İn vitro oosit maturasyon
LMA	Low melting agarose
mosM/kg	Ozmolarite
mtDNA	Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
Na ₂ EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NER	Nucleotide excision repair

nm	Nanometre
NMA	Normal melting agarose
OPU	Oosit toplama
PBS	Fosfat buffer solüsyonu
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reactive oxygen species
SCGE	Single cell gel electrophoresis
SCSA	Sperm chromatin structure assay
-SH	Sülfür
sp	Spermatozoon
sperm-TALP	Sperm-Tyroses's-albumin-lactat-pyrovate
SR	Serbest radikaller
TdT	Terminal deoksinukleotidiltransferaz
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic acid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tunel	Flow cytometric terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein dUTP nick-end labeling
™	Trademark symbol
U	Unit
YSTG	Yumurta sarısı Tris gliserol sulandırıcısı

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Manda	1
1.2. Manda Spermalarının Özellikleri	7
1.3. Manda Spermalarını Etkileyen Faktörler	10
1.4. Epididimal Manda Spermalarının Özellikleri	11
1.5. Kriyoprezervasyon	13
1.6. Kriyoprezervasyonun Etkileri	16
1.7. Manda Spermalarının Sulandırılması ve Dondurulması	16
1.8. Epididimal Manda Spermalarının Sulandırılması ve Dondurulması	18
1.9. Manda Spermalarının Dondurulması ve İdeal Protokoller.....	20
1.10. DNA Hasarı	24
1.11. DNA Hasarının Sebepleri	25
1.12. Spermatozoon DNA Yapısı	26
1.13. Spermatozoon DNA Hasarı ve Önemi	29
1.14. Spermatozoon DNA Hasarını Etkileyen Faktörler	31
1.14.1. Yaş	31
1.14.2. Hormonlar	31
1.14.3. Varikosel	32
1.14.4. Mevsim	32
1.14.5. Genotoksik Maddeler	32
1.14.6. Seminal Plazma	32
1.14.7. Spermanın Sulandırılması	33
1.14.8. Spermanın Kısa Süreli Saklanması	33
1.14.9. Spermanın Uzun Süreli Saklanması	33

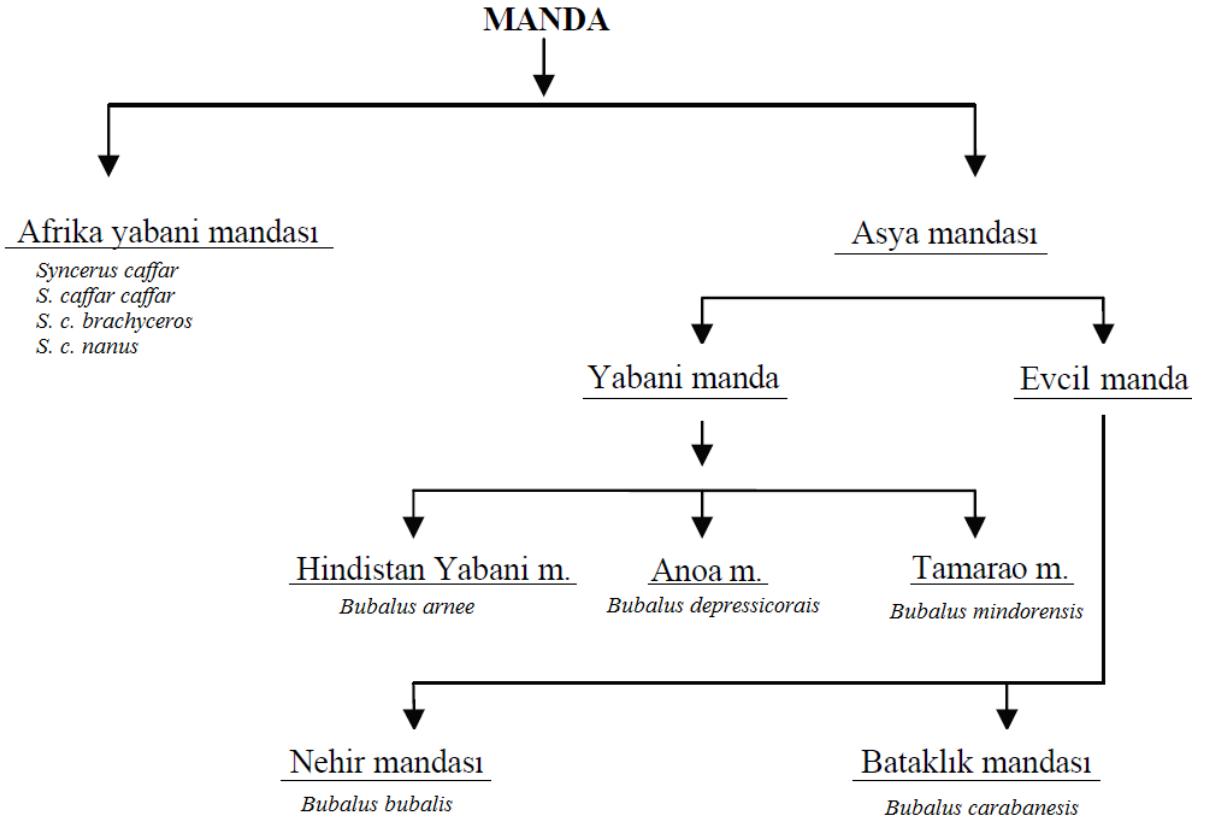
1.14.10. Kryoprotektanlar	34
1.14.11. Serbest Radikallere Maruz Kalma	34
1.15. Spermatozoon DNA Hasarının Embriyo Üzerine Etkisi	35
1.16. DNA Tamir Mekanizmaları	36
1.17. Spermatozoon DNA Hasarı Tespit Metotları.....	37
1.17.1. Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet) Testi.....	37
1.17.2. Tünel Testi.....	41
1.17.3. Spermatozoon Kromatin Yapısı Testi (SCSA)	41
1.17.4. In Situ Translasyon Ölçümü.....	41
1.17.5. Akridin Oranj Boyama.....	42
1.17.6. Spermatozoa Kromatin Dispersiyon Testi.....	42
2. MATERYAL VE METOT	43
2.1. Testislerin Alınması.....	43
2.2. Testislerin Laboratuara Getirilmesi.....	44
2.3. Testis ve Epididimisin Morfometrik Ölçülerinin Alınması.....	45
2.4. Spermanın Elde Edilmesi.....	47
2.5. Kontrol Grubu (Taze Sperma) Muayeneleri.....	48
2.5.1. Taze Spermada Spermatolojik Muayeneler.....	48
2.5.2. Taze Spermada Spermatozoon DNA Hasar Tespiti.....	50
2.6. Deneme Grubu (Dondurulmuş Sperma) Muayeneleri.....	53
2.6.1. Spermanın Sulandırılıp Dondurulması	53
2.6.2. Dondurulmuş Spermanın Çözdürülmesi.....	54
2.6.3. Dondurulmuş Spermada Spermatolojik Muayeneler.....	54
2.6.4. Dondurulmuş Spermada DNA Hasar Tespiti.....	54
2.7. İstatistiksel Analiz.....	54
3. BULGULAR	55
3.1. Testis ve Epididimisin Morfometrik Ölçüm Bulguları.....	55
3.2. Spermatolojik Muayene Bulguları.....	56
3.3. Spermatozoon DNA Hasarı Bulguları.....	56
4.TARTIŞMA.....	64
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	76

KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	102

1. GİRİŞ

1.1. Manda

Dünya manda popülasyonu en yoğun Asya kıtasındadır. Manda, zoolojik olarak *Bovidae* familyasına ait olup, Afrika yabani mandası ve Asya mandası olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Şekil 1). Asya mandası da yabani manda ve evcil manda olmak üzere iki grup altında toplanır. Dünyada evcil ve yabani formlardan köken alan mandaların 70’den fazla ırkı bulunmaktadır. Bu ırklardan evcilleşmiş olanlar beden yapısı, verim özellikleri, kromozom sayısı ve yetiştiricilikteki önemi açısından nehir mandası ve bataklık mandası olarak iki gruba ayrılır (Van Den Berg, 1990). Bataklık mandasının Çin’den, nehir mandasının da Hindistan’dan köken aldığı düşünülmektedir (Lei ve ark., 2007). Nehir mandası ($2n=50$) ve bataklık mandası ($2n=48$), diploid kromozom sayısı içeriği açısından farklılık gösterir (Di Berardino ve Iannuzzi, 1982).



Şekil 1. Manda ırklarına ait genel gruplandırma (Van Den Berg, 1990'den uyarlanmıştır)

Nehir mandaları, genellikle et ve süt verimi için yetiştirilen kombine ırklardır. Süt verimi için kullanılan başlıca manda ırkları; Murrah, Surti, Jafarabadi ve Nili-Ravi'dir (Perera, 2011). Bataklık mandaları ise, süt verimleri düşük olmasına rağmen et verimi ve gücünden yararlanmak için yetiştirilir. Türkiye'de var olan ve uzun yıllardır yetiştiriciliği yapılan mandalar, nehir mandalarının alt grubu olan Akdeniz mandalarından köken almakta ve "Anadolu mandası" olarak isimlendirilmektedir (Atasever ve Erdem, 2008).

Mandanın reproduktif özellikleri, çevresel faktörlerden etkilenmekte ve sığıra nazaran koyuna daha çok benzerlik göstermektedir (Presicce, 2007). Manda düveleri genellikle yetişkin vücut ağırlığının %55-60'ına ulaştıklarında puberta görülür. Pubertaya erişme yaşı 18-46 ay arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Bu geniş aralığın sebepleri arasında; genotip, beslenme, idare, sosyal çevre, iklim koşulları, doğum mevsimi ve hastalıklar yer almaktadır (Jainudeen ve Hafez, 1993). Borghese (2005), bataklık mandalarının 21-24 aylık, nehir mandalarının 15-18 aylık yaşta ilk östrusu gösterdiği bildirilmiştir. Bazı manda ırklarında (Murrah, Akdeniz ve Jafarabadi) yapılan araştırmalar (Crudeli ve ark., 1997), sığıra oranla mandadaki reproduktif gelişimin daha yavaş olduğunu göstermiştir. Mandalar sığırlara göre pubertaya daha geç ulaşmaktadır fakat, daha uzun bir reproduktif yaşama sahiptirler (Borghese, 2005). Dişi mandalarda puberta yaşı, östrus süreleri, gebelik süreleri gibi reproduktif bazı özellikler Tablo 1'de verilmiştir. Bu hayvanlarda temel kızgınlık belirtileri yerinde duramama, sık ve az miktarda idrar yapma ve böğürmedir. Dış bakıda meydana gelen vulvanın şişmesi, vulvada yatay olarak bulunan kırışıklıkların yok olması, vestibular kızarıklık gibi fiziksel değişimler, hayvanların bireysel olarak düzenli muayenesi ile saptanabilmektedir (Aksoy ve Tekin, 1991). Östrus sırasında serviksten salgılanan mukus, ineklerdekinden daha az miktardadır ve hayvanın mukus üzerine yatması ya da aynı anda idrarını yapması nedeniyle genellikle ineklerde olduğu gibi vulvadan ipliksi tarzda aşağı akma sıklıkla gözlenememesine rağmen vaginal muayenede, vaginada birikmiş halde gözlenebilmektedir (Awasthi ve ark., 2007).

Tablo 1. Mandalarda reproduktif özellikler (Perera ve ark., 2005'ten uyarlanmıştır)

<u>Parametre</u>	<u>Ortalama</u>	<u>Minimum - Maksimum</u>	
Pubertaya ulaşma yaşı (ay)	30	16-46	
Pubertaya ulaşma ağırlığı (kg)	275	200-350	
Östrus siklusunun süresi (gün)	21	17-26	
Östrus süresi (saat)	10	5-27	
Ovulasyon zamanı (Östrusun başlangıcından sonraki saat)	34	24-48	
Gebelik süreleri (gün)	Nehir mandası	310	300-320
	Bataklık mandası	330	320-340
Yavruların doğum ağırlığı (kg)	26	22-36	
Uterusun involüsyon süresi (gün)	30	25-35	

Gebeliğin erken teşhisi, yaklaşık 20. günden itibaren ultrasonografi ile (Presicce ve ark., 2001), 45. günden itibaren de rektal palpasyon ile mümkündür. Postpartum anöstrus ya da inaktif periyotlar mandalarda yüksek yaygınlığa sahiptir. Postpartum anöstrus ve inaktif periyotlar ineklerle karşılaştırıldığında genellikle daha uzundur. Mandalar post-partum 30-90. gün arasında değişen bir süre sonunda siklik aktivite göstermeye tekrar başlayabilirler, fakat yetersiz besleme, vücut kondisyonu (Baruselli ve ark., 2001), kötü bakım şartları (Usmani ve ark., 1990) ve iklim koşulları bu süreyi uzatabilmektedir.

Mısır mandalarında yapılan bir çalışmada boğaların ilk ejakülasyon ve puberta yaşının (14,2 ay) birçok manda ırkına göre oldukça erken olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada ilk seksüel belirtiler ve spermatogonyumlarda mayoz bölünmenin 9 ay kadar erken bir sürede gözlenmesi nedeniyle prepubertal uygun bakım ve beslemenin, erkek mandaların pubertaya ulaşma süresinde önemli olduğu düşünülmektedir (Ali ve ark., 1981).

Dünyadaki manda nüfusunun aşağı yukarı 170 milyon baş olduğu ve bu sayının da yaklaşık olarak %97,19'unun Asya ülkelerinde olduğu bildirilmektedir (FAO, 2013). Günümüzde Asya'da, Avrupa'da, Afrika'da, Güney Amerika'da ve Avustralya'daki 40'a yakın ülkede çeşitli sayılarda yapılmakta olan (Nanda ve Nakao, 2003) manda yetiştiriciliği Dünya'da en yaygın olarak sırasıyla Hindistan (%55),

Pakistan (%17) ve Çin'de (%13) yapılmaktadır (FAO, 2010). Bazı ülkelerdeki manda popülasyon sayıları Tablo 2' de verilmiştir (FAO, 2013).

Tablo 2. Çeşitli ülkelerdeki yıllara göre manda popülasyonu (baş) (FAO, 2013)

Ülke	2000	2004	2007	2011
Hindistan	96534000	99724000	105340000	112916000
Pakistan	22669000	25500000	28147000	31726000
Çin	22689620	22287212	22720762	23382130
Mısır	3717000	3845000	4104810	3800000
Vietnam	2814452	2869802	2996400	2712000
Tayland	1612534	1737698	1743546	1698000
İran	523500	510000	420000	375000
İtalya	193774	223393	231000	365086
Irak	120000	111000	396000	300000
Türkiye	138000	113356	100516	84726
Bulgaristan	9277	7875	8247	9241
Suriye	2794	4000	6000	5000
Yunanistan	1000	1110	1389	1600
Dünya	168899181	174138073	184054082	195397515

Türkiye'de son yıllarda manda sayısında büyük bir düşüş gözlenmiştir. Dünya'daki manda varlığı 1970-2011 yılları arasında 107262746 baştan %82 artışla 195266180 başa ulaşmışken; Türkiye'de ise aynı zaman diliminde 1178000 baştan %92,8 azalma ile 84726 başa düşmüştür (FAO, 2014).

Dünya'da süt, et ve çeki hayvanı olarak önemli ekonomik etkinliğe sahip bir çiftlik hayvanı olan mandanın (Nanda ve Nakao, 2003), Türkiye'de yetiştiriciliği süt (peynir, yoğurt, lüle kaymağı, dondurma) ve et (pastırma, sucuk, salam) üretimi amacıyla yapılmaktadır. Fakat ülkemizde manda yetiştiriciliği yapan işletmeler geleneksel aile tipinde olup, %83'ü küçük kapasiteli (1-5 baş), geri kalan %17'si ise Türkiye koşulları için orta kapasiteli sayılabilecek ortalama 8 baş mandaya sahip işletmelerdir (Borghese ve Mazzi, 2005).

Ülkemizde manda yetiştiriciliği birçok bölgede yapılmaktadır. Bölgelerdeki yoğunlaşma; Karadeniz Bölgesi'nin sahil şeridinde Samsun ve Sinop, iç kesimlerinde

Tokat, Çorum ve Amasya; İç Anadolu Bölgesi'nde Sivas ve Yozgat; Ege Bölgesi'nde Afyon; Marmara Bölgesi'nde İstanbul; Doğu Anadolu Bölgesi'nde Muş; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ise Diyarbakır şehrinde. Türkiye'de yetiştirildiği bölgelere göre Dombay, Camız, Camış ve Kömüş gibi farklı isimlerle anılan mandalar “su sığırı” olarak da bilinmektedir (Sarıözkan, 2011).

Dünya'da bataklık mandaları tipik olarak nehir mandaları ile karşılaştırıldığında daha küçük ve daha az verimli olmakla birlikte çoğunlukla Güneydoğu Asya'da bulunmaktadır. Burada daha çok gücünden yararlanmak ve köylerde bir et kaynağı amacıyla kullanılır. Bunun yanısıra kaba yemden ve çok farklı arazi alanlarından daha iyi faydalanmaktadır. Diğer yandan, nehir mandaları yüksek süt verimi ve daha yoğun genetik seleksiyon ile karakterizedir. Bundan dolayı, manda yetiştiriciliği ve çiftlik idaresi Hindistan, Pakistan, Mısır ve İtalya gibi ülkelerde genellikle entansif olarak yapılabilmektedir (Zicarelli, 2001).

Manda, yetersiz fertiliteye sahip olması nedeniyle geleneksel olarak kötü bir damızlık olarak kabul edilmektedir. Bu durumun sebepleri geç pubertaya ulaşma, doğum sonrası uzun anöstrus aralıkları, östrus belirtilerinin yetersiz oluşu, düşük gebelik oranları ve uzun yavrulama aralıkları şeklinde kendini gösterir (Jainudeen ve Hafez, 1993; Barile, 2005). Bununla beraber yapılan çalışmalarla fertilitenin kabul edilebilir düzeylere getirilmesinin, genotiplerin çevreye uyumu ile hayvanların düzgün idare ve beslenmesi sayesinde sağlandığı gösterilmiştir (Perera ve ark., 1987; Usmani ve ark., 1990; Vale, 1996).

Mandada kızgınlık belirtilerinin yetersiz oluşu (Ohashi, 1994, Seren ve ark. 1995), 4 saatten 64 saate kadar değişebilen kızgınlık süresi ve ovulasyon zamanının saptanmasındaki zorluklar bu türde suni tohumlama gibi biyoteknolojik uygulamaların kullanımını güç bir hale getirmektedir (Baruselli, 2001). Dışide kalıtsal olarak geç pubertaya ulaşma, özellikle yaz mevsiminde kızgınlık belirtilerinin yetersiz oluşu, mevsime bağlı hayvandan hayvana değişen üreme özellikleri, uzun buzağılama aralıkları üreme etkinliğini olumsuz etkilemektedir (Şekerden, 2005).

Mandalarda karkas et ve süt verimleri sığırlarla göre daha az olmasına rağmen, kalitesiz kaba yemleri değerlendirme oranları ve yemden yararlanma gücü yüksektir. Besleme kolaylığı, zor olan iklim koşullarına ve hastalıklara karşı dayanıklılıkları, ilave işgücüne gereksinim duymamaları nedeniyle daha düşük maliyetle üretim yapılabilmesi

ve elde edilen ürünlerin daha yüksek fiyata satılması gibi avantajlara sahiptir. Bu avantajlar ile yetiştiricilikte manda önem arz etmektedir. Bunun yanında mandalardan elde edilen et ve sütün, kendine özgü yapısı (sığır etinden %40 daha az kolesterol, %12 daha az yağ, %55 daha az kalori, %11 daha fazla protein ve %10 daha fazla mineral içermesi) sebebiyle de etinin tüketim için daha sağlıklı olduğu bildirilmektedir (Herold ve ark., 2006). Sığır sütüne göre daha fazla miktarda yağ (ortalama %8), protein ve kuru madde içermekle birlikte, daha düşük oranda kolesterol, daha yüksek oranda vitamin A, C, E, B1, B2 içerir ve yapısında bulunan antibakteriyel etkili laktoferrin proteini nedeniyle de daha az bakteri içermektedir (Adam, 1975; Kreul ve Sarıcan, 1993). Bu özelliklerinden dolayı sucuk, peynir, yoğurt ve kaymak gibi ürünlere kendine has ayrı bir kıvam, tat ve lezzet vermektedir. Deri sanayinde özellikle kalın deri gerektiren özel tasarımlarda, derisinin kalın olması nedeniyle ayrı bir yeri olan manda derisi yaygın olarak (ayakkabı, kösele, tasma, yular, çanta gibi) kullanılmaktadır (Küçükkebağcı ve Aslan, 2002). Boynuzlarında ve tırnaklarından kolyeler, küpeler, bilezikler, broşlar, küllük, askılık v.s. süs eşyaları yapılmaktadır. Bu ürünlerin maddi değeri çok yüksek olabilmektedir. Ayrıca mandalardan çok kaliteli gübre elde edilir. Bir hayvandan yılda yaklaşık 10-15 ton gübre alınır (Soysal, 2009).

Mandalarda verimliliği arttırmak amacıyla kullanılan yöntemlerden biri olan suni tohumlama uygulamasında gebelik oranını etkileyen en önemli faktörlerden başında kullanılan dondurulmuş spermanın kalitesi gelmektedir (Saacke, 1984). Abdalla (2003), Mısır'daki mandalarda dişi-erkek etkileşiminin, serbest ve bağlı ahırda barınmanın, otlatmanın ve doğal emzirmenin etkilerini araştırdığı çalışmasında suböstrusun, iyi bir kontrol mekanizmasında bile dişi mandalarda yaygın bir sorun olduğunu göstermiştir. Dişi-erkek etkileşiminin (koku, görsel, ses, dokunma duyusu ve feromonlar yoluyla) devamlılığının mandalarda doğum sonrası siklik aktivitelerin başlangıcı üzerinde olumlu etkisi vardır. Ahır ve meralardaki ortak alanlarda sürekli erkek varlığı, dişi mandalarının doğum sonrası genel üreme performansını optimize edebilmektedir. Sürekli bir boğa varlığında, dişi hayvanlardaki emzirmenin ovaryum aktivitesinin engellenmesi üzerine daha az bir etkisi vardır.

1.2. Manda Spermasının Özellikleri

Manda spermasının özellikleri boğanın ırkına, yaşına, mevsime, ortamda dişi manda varlığı gibi durumlara göre değişkenlik gösterebilmektedir. Manda spermasında renk ve viskozite, spermatozoa yoğunluğuna bağlı olarak değişiklikler gösterir. Manda spermasının rengi genellikle sütlü beyazdan kreme doğru hafif bir maviye çalan değişkenliğe sahiptir (Vale, 1994).

Manda spermasında hacim boğanın cinsine ve yaşına bağlı olarak değişir. Genç boğalarda sperma miktarı 1-3 ml iken, yaşlı boğalarda 6 ml civarındadır (Vale, 1994).

Manda sperması 6,4-7,0 aralığında bir pH'ya sahiptir (Rattan, 1990; Kumar ve ark., 1993; Aguiar ve ark., 1994; Vale, 1997).

Manda spermasında yoğunluk ölçümleri spektrofotometre ya da hematositometre ile yapılmaktadır. Farklı ırklara ait spermatozoon yoğunlukları çeşitli yazarlarca bildirilmiştir. Brezilya'da yetiştirilen manda spermasında yoğunluk $1166,3 \pm 17,5 \times 10^6$ spermatozoon/ml olarak belirlenmiştir (Aguiar ve ark., 1994). Galli ve ark. (1993), İtalya'da yetiştirilen mandalardaki spermatozoa yoğunluğunun $690,6 \pm 187,9 \times 10^6$ ile $1290,7 \pm 100 \times 10^6$ spermatozoon/ml aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Hindistan'ta, Kumar ve ark. (1993), Murrah mandalarındaki yoğunluğun $524,1 \pm 20,7 \times 10^6$ ile $1031,4 \pm 28,7 \times 10^6$ spermatozoon/ml aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Murrah mandalarında yapılan diğer bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Rattan, 1990).

Spermatozoa motilitesi manda ırkları arasında farklılıklar göstermektedir. Aguiar ve ark. (1994), Brezilya'da yetiştirilen mandalarda yaptıkları çalışmada, spermada %78,6 \pm 5,6 oranında motilite oranı belirlemişlerdir. İtalya'da mandalarda motilite %40 \pm 2'den %82 \pm 5'e kadar bir varyasyon göstermektedir (Galli ve ark., 1993). Kumar ve ark. (1993), Hindistan'da yaptıkları araştırmada Murrah ırkı manda spermasında %60,8 \pm 1,5 ile %69 \pm 4 arasında motilite değerleri bulmuşlardır.

Manda spermasında anormal spermatozoa oranı belirlenirken, boyama metodu veya sıvı fikzasyon metodu kullanılıp, baş, orta kısım ve kuyruk anomalileri şeklinde sınıflandırılarak tespit edilmektedir. Irkdan ırka, yaştan yaşa değişiklik gösteren bu oranlar ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar farklılıklar göstermektedir. Nili-Ravi ırkı manda spermasında çoğu anomaliler spermatozoon baş kısımlarında (%5,78 \pm 2,1) bulunmuştur. Aynı zamanda orta kısım anomalileri de %1'den az iken,

kuyruk anomalileri $3,92 \pm 1$ ile $5,7 \pm 0,4$ arasında değişmektedir. Sitoplazmik damlacık oluşumu %1'den daha az saptanmıştır (Saeed ve ark., 1990). Bu anomaliler benzer oranlarda Brezilya manda spermasında (Aguiar ve ark., 1994) ve Murrah manda spermasında da (Kumar ve ark., 1993) gözlenmiştir.

Vale (1994)'nin yaptığı araştırmada elde ettiği manda spermasına ait genel özellikler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Manda spermasına ait genel özellikler (Vale, 1994'den uyarlanmıştır)

<u>Özellikler</u>	<u>Değerler</u>
Renk	Beyaz, sütlü beyaz, çok hafif mavi
Miktar (ml)	3 (2-8)
Motilite (%)	>70
pH	6,7 – 7,5
Yoğunluk (spermatozoon/ml)	600×10^6 - 1200×10^6
Canlı Spermatozoa Oranı (%)	>70
Anormal Spermatozoa Oranı (%)	<70

İbrahim ve ark. (1985)'nin yaptığı araştırmada elde ettiği manda spermasında ve seminal plazmadaki bazı fiziksel ve biyokimyasal parametreler Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Manda spermasında ve seminal plazmasındaki bazı fiziksel ve biyokimyasal parametreler (İbrahim ve ark., 1985'den uyarlanmıştır)

<u>Özellikler</u>	<u>Spermada</u>	<u>Seminal Plazmada</u>
Ozmolarite (mosM/kg)	293,33±3,39	283,75±2,31
Total protein (g/100ml)	3,1±0,1	2,86±0,14
Total lipit (mg/100ml)	321,15±18,41	260,86±12,52
Fruktoz (mg/100ml)	547,08±61,24	684,6±81,14
Sitrik asit (mg/100ml)	368,73±14,82	466,33±31,66
Sodyum (mg/100ml)	260,63±8,81	258,58±13,65
Potasyum (mg/100ml)	153,5±2,68	154,83±3,27
Kalsiyum (mg/100ml)	32,04±2,77	32,42±3,1
Magnezyum (mg/100ml)	6,17±0,41	6,46±0,39
Klorür (mg/100ml)	196,57±2,45	224,06±2,6
İnorganik fosfataz (mg/100ml)	17,02±1,67	12,75±1,09
Asit fosfataz (U/100ml)	225±2,99	230,46±1,48
Alkalin fosfataz (U/100ml)	326,05±2,16	331,2±2,6
Çinko (µmol/l)	14,3	86,88

Manda spermasının, *Bos taurus* spermasından fiziksel ve biyokimyasal özellikler açısından dikkat çekici farklılıkları olduğu bildirilmiştir. Manda sperması sığır spermasına göre yüksek miktarda fruktoz (Abdou ve ark., 1977), asit ve alkalin fosfataz aktivitesi (Abdou ve ark., 1974; 1978) inorganik fosforlar (Abdou ve ark., 1977) ve düşük miktarda askorbik asit (Abdou ve ark., 1977) içermektedir. Spermatozoon asit fosfataz konsantrasyonu, motil ve canlı spermatozoa yüzdeleri, dehidrogenaz aktivitesi ve fruktoz kullanım oranı ile önemli düzeyde doğrudan bir ilişki göstermektedir. Öte yandan, boğa spermasının aksine manda spermasındaki yüksek alkali fosfataz seviyesi, azalan motilite yüzdesi ve canlı spermatozoa yüzdesi, baskılanmış dehidrogenaz aktivitesi ve fruktolitik oranında hafif bir azalma ile eşlik eder (Abdou ve ark., 1978). Mudgal (1992)'a göre manda sperması sığır spermasına göre

daha düşük oksijen kullanım kapasitesi ve aerobik fruktolizis indeksine sahiptir. Manda sperma motilitesi de anaerobik koşullara göre aerobik koşullarda daha hızlı azalır.

Sığıra göre manda sperması düşük dondurulabilir kapasiteye sahiptir. Bunun nedenlerinden biri spermatozoadaki lipit oranındaki farklılıklar olabilir (Jain ve Anand 1976; Tatham 2000; Hiemstra, 2003). Örneğin, fosfatidil kolin manda spermatozoon plazma membranında bulunan tüm fosfolipidlerin yaklaşık olarak %66'sını oluştururken (Cheshmedjieva ve Dimov, 1994), bu değer sığırlarda yaklaşık %50'dir (Parks ve ark., 1987). Benzer şekilde, fosfatidil etanolamin manda spermatozoon membranında bulunan tüm fosfolipidlerin yaklaşık %23'ünü oluşturmaktadır (Cheshmedjieva ve Dimov, 1994), fakat bu değer sığırlarda yaklaşık %10'dur (Parks ve ark., 1987). +4 °C'de kısa süreli saklama esnasında sığır ve manda sperması karşılaştırıldığında, manda spermatozoasının muhtemelen antioksidan enzimlerin azalan aktivitesine bağlı yüksek lipid peroksidasyon nedeniyle oksidatif strese daha eğilimli olduğu gösterilmiştir (Nair ve ark., 2006).

1.3. Manda Spermasını Etkileyen Faktörler

Mandalarda sperma kalitesini ve özelliklerini etkileyen faktörlerin araştırıldığı çalışmalarda birçok faktörün etkinliği bildirilmiştir. Bu faktörlerin başında mevsim, dolayısıyla fotoperiyodizm gelmektedir. Fotoperiyot mandalarda üreme ve cinsel aktiviteyi etkileyen önemli bir çevre faktörüdür (Vale, 1997). Fotoperiyodun cinsel aktivite ve libido ile birlikte spermanın kalitesi ve dondurulabilirliğini etkileyebilecek bir faktör olduğu da bildirilmiştir (Sansone ve ark., 2000). Androjenler mevsimsel faktörlerden etkilenir ve dişi varlığı ile uyarılır (Malfatti ve ark., 2006). Dünyanın ılıman bölgelerinde, mandalarda sperma kalitesinin yaz ve sonbahar aylarına göre kış ve ilkbahar aylarında daha iyi olduğu bulunmuştur (Mohan ve Sahni, 1990; Galli ve ark., 1993). Tropikal bölgelerde, sperma kalitesinin yağışlı mevsimlerde daha iyi olduğu gözlenmiş, sıcak ve nemli tropikal Amazon bölgesinde ise kaliteli sperma elde etmek için en iyi zamanın Ocak ve Haziran ayları arasında olduğu bildirilmiştir (Vale, 1994). Mandalar ısı stresine çok duyarlıdır, bu nedenle yılın sıcak mevsimlerinde sperma kalitesinde bir azalma durumu sık görülen bir bulgudur. Bu konuda araştırmacılar, yaz aylarında spermatozoanın dondurma stresine çok hassas olduğunu ve bu sebeple sadece

kış ve bahar aylarında dondurulma işleminin yapılması gerekliliğini önermişlerdir (Perera ve ark., 1979).

Mevsim dışında beslenme ve barınma dahil olmak üzere çiftlik idaresinin de mandalarda sperma üretimi ve kalitesi üzerine etkisi vardır (Chinnaiya ve Ganguli, 1990).

Diğer bir faktör mandaların yaşıdır. Murrah ırkı (Chinnaiya ve Ganguli, 1990; Kumar ve ark., 1993) ve Nili-Ravi ırkı (Saeed ve ark., 1990) mandalarında yapılan çalışmalarda en iyi kalitede sperma elde etmek için spermatozoa morfolojisi açısından uygun yaş aralığının 3–5 yaş olduğu belirlenmiştir.

Campanile ve ark. (2006), kanda artan üre seviyesi ile düşük fertilité arasında bir ilişki olduğunu vurguladığı gibi ineklerde olduğu gibi mandalarda suni tohumlama programlarının uygulanması metabolik ve beslenmeye bağlı bir dizi faktörler nedeniyle tehlikeye girebilir.

Sonuç olarak, beslenme, barınma ve yaş boğalardaki bireysel sperma kalitesi üzerinde güçlü bir etkiye sahip olabilir (Chinnaiya ve Ganguli 1990).

1.4. Epididimal Manda Spermasının Özellikleri

Mevsim, hayvanın yaşı, beslenme durumu gibi birçok çevresel ve fizyolojik faktörler dışında mandalarda epididimal sperma özellikleri üzerine epididimislerin laboratuvara getirilmesi, kullanılan sulandırıcının özellikleri ve tercih edilen dondurma protokolleri etkili olabilmektedir.

Mandalarda epididimal sperma ile ilgili yapılan çalışmalarda testislerin kesim sonrası laboratuvara ulaştırılma konusu büyük önem taşımaktadır. Doku dejenerasyonun zararlı etkileri nedeniyle spermatozoanın post-mortem elde edilmesi işleminin ivedilikle yapılması önerilmektedir (Hopkins ve ark., 1988). Erişkin mandalarda epididimal spermatozoa miktarlarını araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda toplamda ve caput, corpus ve caudada elde edilen spermatozoa miktarları Tablo 5’da sunulmuştur.

Tablo 5. Erişkin mandalarda epididimal spermatozoa miktarları

Araştırmacı	Tür	Spermatozoon Yüzde Dağılımları (%)			
		Toplam spermatozoa (x 10 ⁹)	Caput (%)	Corpus (%)	Cauda (%)
Sharma ve Gupta (1978)	Bubalus Bubalis	36,2	30,76	4,25	64,99
McCool ve Entwistle (1989)	Avustralya Nehir mandası	9,7±0,07	28,82	14,63	60,55

Rat, kobay, hamster ve insanlarda olduğu gibi (Turner ve Reich, 1985) *Bos taurus* (sığıır) boğalarının spermatozoası da motil olmasına rağmen epididimis içerisinde immotil halde saklanmaktadır. Bu immotil duruma cauda epididimis sıvısında varolan pH'ya bağımlı etkenlerin neden olduğu ileri sürülmüştür. Ejakülasyon sırasında eklenti bezi salgılarıyla bu pH dengelenerek spermatozoa aktif motil hale gelmiş olur. Mandalarda epididimal spermanın sulandırıcı ile karıştırılmasından sonraki motil yeteneği açığa çıkarma süresi 2-5 dakikadır (Acott ve Carr, 1984). Bu yüzden sulandırma sonrası ilk muayenede spermatozoanın hepsi motil olmayabilir. Dondurma işlemi öncesinde immotil olarak gözlenen bazı spermatozoonlar sperma sulandırıcısına maruz kalması ile sonradan motil hale gelirler (Herold ve ark., 2004b).

Elde edilen epididimal manda spermasının yapılan çalışmalarda genellikle dondurulması amaçlanmıştır. Bu çalışmalarda dondurulmadan önceki spermatolojik parametre değerleri de kaydedilmiştir. Ticari sulandırıcılar olan AndroMed® ve Triladyl™ sulandırıcılarının karşılaştırdıkları bir araştırmada Afrika mandalarında epididimal spermada sırasıyla %35±21 ve %21±9 oranında progresif motilite sonuçları elde edilmiştir (Herold ve ark., 2006). Tris-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcısı (3,028 gr Tris (hydroxy methyl) amino methane, 1,675 gr sitrik asit monohidrat, 1,25 gr fruktoz, 500-1000 IU/ml Penicillin G sodium, 500-1000 µg/ml streptomycin sulphate, %10 yumurta sarısı, %7 gliserol ve iki kez işlem görmüş distile su ile 100 ml'ye tamamlama) ile sulandırılan manda epididimal spermasında %72,75±0,91 oranında progresif motilite sonuçları saptamıştır (Hiron ve ark., 2006). Yine ticari sulandırıcılar olan AndroMed®, Triladyl™ ve Red Ovine Freezing Buffer sulandırıcılarının karşılaştırıldığı bir çalışmada epididimal manda spermasında sırasıyla %31±21,

%19±11 ve %24±15 oranında progresif motilite sonuçları elde edilmiştir (Herold ve ark., 2004b).

Mandalarda taze epididimal spermada anormal spermatozoa parametrelerinin ve ölü spermatozoa oranının değerlendirildiği çalışmalarda çeşitli veriler elde edilmiştir. Akrozomal bütünlüğün ve ölü spermatozoa oranının araştırıldığı bir çalışmada, 1995 ve 1996 yıllarında yapılan değerlendirmelerde bu yıllar için sırasıyla %89,3±2,3 ve %93,5±2,2 oranlarında akrozomal bütünlük tespit edilirken, ölü spermatozoa oranı için sırasıyla %9,6±2 ve %15,6±1,1 verilerini elde edilmiştir (Lambrechts ve ark., 1999). Başka bir çalışmada %80,33±0,33 oranında akrozomal bütünlük tespit edilirken, elde edilen ölü spermatozoa oranı %17,67±0,33 olarak bulunmuştur (Kumar ve ark., 2008). Yine bir başka çalışmada elde edilen akrozomal bütünlük ve canlı spermatozoa oranları sırasıyla %80,2±1,08 ve %83,6±0,95 olmuştur (Singh ve ark., 2007).

1.5. Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon; hem sulandırma-soğutma-dondurma işlemleri hem de çözündürme işlemleri esnasında meydana gelen ozmotik ve termik şoklara karşı hücrelerin yüksek düzeydeki biyolojik uyumunu kapsayan fizyolojik olmayan bir yöntemdir (Watson ve ark., 1992; Holt, 2000a; 2000b). Dondurma-çözündürme işlemleri sırasında meydana gelen hasarlar esas olarak hücre zarını (plazma ve mitokondriyal), en kötü durumda da hücre çekirdeğini etkilemektedir (Blesbois, 2007). Hücre zarındaki hasarların, spermatozoa canlılığı ve adenosin trifosfat (ATP) konsantrasyonu da dahil olmak üzere birçok farklı metabolik faktörler üzerine etkileri vardır (Andrabi, 2009).

Yaklaşık yüz elli yıl önce kümes hayvanları ve boğa spermasının dondurulması amacıyla soğutulma işlemi (Polge ve ark., 1949; Polge ve Rowson, 1952) ve gliserolizasyon işlemi için yumurta sarısı içeriğindeki koruyucu ajanların keşfi (Phillips ve Lardy, 1940) sperma dondurulma işleminin kilometre taşlarıdır. Yıllar içinde, sperma dondurulmasında birçok tür için yöntemlerin geliştirilmesi amacı ile deneysel olarak tasarlanmış teknik ayarlamalar kullanıma girmiştir (Graham, 1996; Gunasena ve Critser, 1997; Johnson ve ark., 2000; Salamon ve Maxwell, 2000).

Spermanın sıcaklığının +4°C'ye düşürülmesi hücresel metabolik aktiviteyi azaltmakta ve hücrenin yaşam süresini uzatmaktadır (Hammerstedt ve Andrews, 1997).

Kriyoprezervasyon işlemi sıcaklığın azaltılması, hücrel dehidratasyon, dondurma ve çözürme adımlarını içermektedir. Hücre içi suyun donma riski ve buz kristalleri oluşumunun mekanik stresi ile hücrel yapıların bozulma olasılığı -10°C civarındaki sıcaklıklar için kritik değer arz etmektedir (Gao ve ark., 1997; Karow, 1997). -5°C civarındaki sıcaklıklarda hücre içi ve hücre dışı su aşırı soğutulmuş yarı kararlı bir halde olarak donmamış şekilde bulunur. -5°C ile -10°C arası hücre içi su aşırı soğutulmuş halde kalırken, hücre dışı medyum buz yapısı haline gelmektedir. Kimyasal dengedeki hücre içi ve hücre dışı sıvı varlığı hücrel dehidrasyonu doğurur. Bu noktada soğutma oranı hücrel dehidrasyonun meydana gelmesine imkan tanır hızda olmalı ve hücre içi suyun donmasına engel olmalıdır. Şiddetli dehidrasyon, makro moleküllerin denatürasyonu ve hücrelerin aşırı büzülmesi sonucu oluşan solüsyon etkisi hasarı geri dönüşümsüz membran yıkımına dahi yol açabilir. Bir diğer hasar ise buz oluşumunun hücre çevresinde meydana getirdiği mekanik streştir (Gao ve ark., 1997).

Soğuk şoku etiyojisi, metabolik fonksiyonlardaki değişiklikler ile hücrel membrandaki hasarı ve membran bileşenlerinin düzenlenmesindeki değişikliklerden kaynaklanan muhtemel nedenleri içerir. Soğutmanın -soğuk şokunun- zararlı etkisi kolesterol/fosfolipit oranı, lipit içeriği, hidrokarbon zinciri doygunluk derecesi ve protein/fosfolipid oranı gibi membran elemanlarının bileşimine bağlıdır (Parks, 1997). Aynı zamanda oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile ilişkilidir (Chatterjee ve ark., 2001). Domuz spermatozoası çoklu doymamış yağ asidi içeriğine yüksek oranda sahip olduğundan lipid peroksidasyonuna çok duyarlıdır (Comaschi ve ark., 1989; Cerolini ve ark., 2000). Lipid peroksidasyonunun etkileri; geri dönüşü olmayan motilite kaybı, solunum inhibisyonu, hücre içi enzimlerinin kaçığı ve spermatozoon DNA hasarıdır (White, 1993). Farklı türler özel spermatozoon membran yapısı gösterdikleri için (Bennett ve White, 1997; Parks, 1997; Cross, 1998), soğuk şokunun spermatozoon üzerindeki etkisi türler arasında farklılık gösterir. Bu sebepten dolayı en duyarlı olan domuz spermasıdır, boğa, koç ve aygır spermaları daha az duyarlıdır. Bunların yanında kedi ve köpek spermaları bir miktar duyarlı iken tavşan, horoz ve insan spermaları ise en az duyarlıdır (Cross, 1998).

Yumurta sarısı ile sütün içeriğindeki bileşikler ve koruyucu mekanizmaların nasıl gerçekleştiği daha tamamen aydınlığa kavuşmamış olmasına rağmen, yumurta sarısındaki koruyucu mekanizmanın fosfolipidler ve düşük yoğunluklu lipoprotein

bileşenleri ile, sütteki koruyucu mekanizmanın da protein fraksiyonu ile gerçekleştiğine inanılmaktadır. Yumurta sarısı içeriğindeki fosfolipidler spermatozoon üzerindeki soğutma hasarını membran bileşimi ve/veya fiziksel özelliklerini değiştirmeden azaltabilmektedir (Parks, 1997).

Kriyoprotektan ajanların kullanımı hücre içi buz kristal oluşumunu engellemek için çok önemlidir. En çok kullanılan kriyoprotektan gliseroldür. Permabl bir kriyoprotektan olan gliserol; hücre dehidrasyonunun ozmotik uyarımı ile hücre dışı bir etki oluşturarak donma için hücre içinde gerekli olan su miktarını sağlamış olur. Gliserolün hücre içi etkilerinden biri hücre membranına yapışarak dehidrasyon sonucu oluşacak hücre içi ozmotik stresi azaltmasıdır. Bu durum hücre hacminin korunması için gerekli hücre içi suyun yerine konması, iyonlarla ve makro moleküllerle etkileşim ve suyun donma derecesinin baskılaması ile meydana gelir. En uygun dondurma oranının tespit edilmesi için önem arz eden hücre özellikleri; kriyoprotektanların kullanım konsantrasyonları ve tiplerinin yanı sıra membran geçirgenliği, aktivasyon sıcaklıkları ve fiziksel strese karşı membranın bütünlüğü olarak sıralanabilir. Farklı türlerin spermatozoonları kalıtsal olan hücre formları, hücre hacimleri, organel boyutları ve bileşimlerinden dolayı başarılı bir dondurma için çeşitli protokoller gerektirmektedir (Medeiros ve ark., 2002).

Sperma dondurma protokollerinin gelişimi; sulandırıcı bileşimleri (içerdiği kriyoprotektanlar), farklı oranlar, soğutma koşulları, çözündürme, spermatozoon konsantrasyonu ve kullanılan sonuç değerlendirme metotlarındaki çok sayıda farklı kombinasyonlar ile denenerek sağlanmıştır (Holth, 2000b). Yıllar içinde sperma dondurma çalışmalarında bazı türe özgü protokoller standart olarak belirlenmiştir. Boğa (Vishwanath ve Shannon, 2000), koç (Salamon ve Maxwell, 2000), domuz (Johnson ve ark., 2000), keçi (Leboeuf ve ark., 2000) ve (Graham, 1996; Ecot ve ark., 2000) gibi çiftlik hayvanları için sperma dondurmasındaki çalışmalar sonucu açıklayıcı protokoller ve fertilité sonuçları yayınlanmıştır. Reprodüksiyon alanında kullanım için birçok türde taze spermadaki motilité oranını %50 civarında koruyabilen sperma dondurma protokolleri başarılı makul bir sonuç olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte iyi bir fertilitéye ulaşmak için gerekli tohumlama dozundaki motil spermatozoon sayısı türler arasında değişkenlik göstermektedir. Dondurulmuş spermanın yeteri kadar yüksek

dozda kullanılması ile bazı türlerde, taze sperma ile elde edilen fertilité oranları dondurulmuş sperma ile de elde edilebilir (Holth, 2000b).

1.6. Kriyoprezervasyonun Etkileri

Genel olarak dondurma işleminin, spermatozoon canlılığı üzerinde %50'den fazla oranda azalmaya neden olabildiği kabul edilmektedir (Watson, 1979). Soğutma-dondurma-çözdürme işlemleri, spermatozoon membranı üzerinde spermatozoon canlılığının ve fertilizasyon yeteneğinin azalmasına sebep olan fiziksel ve kimyasal stres meydana getirir (Chatterjee ve ark., 2001). Meydana gelebilecek durumlara karşı hücrenin vereceği olası yanıtlar Tablo 6'de verilmiştir (Morris ve Clarke, 1987).

Tablo 6. Hücrenin dondurulup-çözdürülmesinden meydana gelen hasarların kaynakları (Morris ve Clarke, 1987'den uyarlanmıştır)

Karşılaşılan Durum	Hücrenin muhtemel cevabı
Sıcaklık azalması	Membran lipit faz değişiklikleri ve hücre iskeletinin depolimerizasyonu
Çözünen madde artışı	Ozmotik büzüşme
İyonik madde artışı	Membran üzerine direk etki, membran proteinlerinin çözünmesine neden olma
Dehidrasyon	İki katmanlı lipit yapısının destabilizasyonu
Hava kabarcığı oluşumu	Membranlara ve hücre iskeletine mekanik hasar
Solüsyon viskozitesinde artış	Difüzyon işleminin muhtemel kısıtlanması
pH'da meydana gelen değişiklikler	Protein denatürasyonu
Hücreler arası direk etkileşim	Membran hasarı

1.7. Manda Spermasının Sulandırılması ve Dondurulması

Manda spermasının dondurulması amacıyla sitratlı-sitrik asit bazlı, tris bazlı laboratuvar ortamında hazırlanan sulandırıcılar ile ticari olarak satılan birçok sulandırıcı kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda spermanın sulandırılması ve dondurulmasında spermatolojik parametrelerden motilite, anormal spermatozoa oranı, ölü spermatozoa oranı ve plazma membran bütünlüğü gibi parametreler incelenmiştir.

Waheed ve ark. (2012), çalışmasında laboratuvar ortamında Tris, sitrik asit, fruktoz, yumurta sarısı (tavuk), ördek yumurta sarısı, gliserol, penicilin ve streptomycin maddeleri kullanılarak 5 farklı kombinasyonda hazırlanan sulandırıcılar ile sulandırma işlemi uygulanmıştır. Suni vajen ile elde edilen ve %60 üzeri oranda motiliteye sahip

spermaların kullanıldığı çalışmada taze spermanın sulandırılma işlemi sonrası elde edilen ortalama motilitesi $69,3 \pm 0,43$ olarak bulunmuştur. Plazma membran bütünlüğünün ortalama $84,82 \pm 0,25$ olarak gözlemlendiği bu çalışmada, ortalama baş anomalileri oranı $8,28 \pm 0,19$, ortalama orta kısım anomalileri oranı $1,65 \pm 0,05$ ve ortalama kuyruk anomalileri oranı $11,73 \pm 0,23$ olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada spermaların dondurulması sonucu elde edilen ortalama çözüm sonu motilitesi $48,83 \pm 0,45$ olarak bulunmuştur.

Suni vajen ile elde edilen ve %70 üzeri motil sperma örneklerinin kullanıldığı, yine laboratuvar ortamında hazırlanan Tris-yumurta sarısı-sitrat sulandırıcısı ile sulandırıldığı bir başka çalışmada çözüm sonu %28 motilite oranı gözlenmiştir (Kadirvel ve ark., 2009).

Ticari bir sulandırıcı olan Bioxcell® ile laboratuvar ortamında hazırlanan Tris-sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısının karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiği ve %80 ve üzeri motil sperma örneklerinin kullanıldığı çalışmada çözüm sonu motilite değerleri sırasıyla %47,20 ve %39,16 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada Bioxcell® sulandırıcısı için çözüm sonu akrozomal bütünlük oranı %21,96, hipoozmotik şişme testi (HOST) oranı %45,96 ve canlı spermatozoa oranı %61,88 olarak bulunurken, Tris-sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı için bu değerler sırasıyla %19,28, %42,92 ve %55,08 olarak bulunmuştur (Asr ve ark., 2011).

Chinnaiya ve Ganguli (1980), yaptıkları çalışmada, sitratlı veya sitrik asit bazlı sulandırıcılara göre Tris-bazlı sulandırıcılarla daha iyi çözüm sonu motilite elde edildiğini saptamışlardır.

Karşılaştırmalı olarak yapılan bir çalışmada, Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı, yumurta sarısı-sitrat, yumurta sarısı-glukoz-bikarbonat, yumurta sarısı-yağsız süt ve ticari bir sulandırıcı olan Laiciphos-271 sulandırıcıları arasında yumurta sarısı-yağsız süt ve Laiciphos sulandırıcıları diğer sulandırıcılardan daha yüksek çözüm sonu motilite değerleri vermiştir (Nour, 1980).

Abdel-Rahman ve ark. (1988), sperma sulandırma işlemi için yağsız sütlü sulandırıcılar yerine Tris-tabanlı ticari bir sulandırıcı olan Triladyl'in daha olumlu sonuçlara sahip olduğunu saptamışlardır.

Yine Tris-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcısı ile yapılan başka bir çalışmada tavuk yumurta sarısı yerine ördek yumurtası, Gine hindi yumurtası ve Hint yerli tavuk

yumurtası kullanılmıştır. Ticari olarak satılan tavuk yumurta sarısının karşılaştırıldığı çalışmada sonuçlar Tablo 7’te verilmiştir (Andrabi ve ark., 2008).

Tablo 7. Sulandırıcılara tavuk yumurta sarısı, ördek yumurta sarısı, Gine hindi yumurta sarısı, Hint yerli tavuk yumurta sarısı ve ticari yumurta sarısı eklenmesinin karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi (Andrabi ve ark., 2008’den uyarlanmıştır)

Kullanılan yumurta sarısı	Çözüm sonu motilite (%)	Anormal spermatozoa oranları (%)		
		Baş	Orta	Kuyruk
Ördek yumurta sarısı	56±3,0	0,8±0,2	0,4±0,2	7,90±1,5
Gine hindi yumurta sarısı	57±1,2	0,8±0,2	0,9±0,4	13,5±2,5
Hint yerli tavuk yumurta sarısı	54±1,9	1,3±0,4	1,0±0,2	17,5±0,7
Ticari tavuk yumurta sarısı	53±1,2	1,3±0,4	0,3±0,1	15,0±1,3

1.8. Epididimal Manda Spermasının Sulandırılması ve Dondurulması

Sperma sulandırıcıları ejaküle sperma için tasarlanmış olduğundan, elde edilen epididimal spermatozoaya seminal plazma ve sulandırıcının eklenme işlemi ve bu işlemin sırasının motilite kabiliyeti üzerinde bir etkisi olabilir. Ejaküle spermanın dondurulmasında spermatozoa, sulandırıcı ile seyreltilmeden önce seminal plazma ile temas etmektedir. Bu yüzden epididimisten elde edilen spermatozoanın önce sperma sulandırıcısı ile yıkanıp daha sonra seminal plazma eklenmesi doğru olmayabilir. Bu durumda sadece birkaç damla sulandırıcının kullanıldığı bir deneme önerilebilir. Seminal plazma ancak ondan sonra eklenmelidir ve daha sonra sadece sperma sulandırıcısı ile seyreltilmelidir (Herold ve ark., 2004a).

Yapılan araştırmalarda, kullanımında kontaminasyon riski taşıyan yumurta sarısını içeren sulandırıcılar kullanılmıştır (Herold ve ark., 2004a, Herold ve ark., 2004b, Herold ve ark., 2006, Asr ve ark., 2011). Ayrıca yumurta sarısı steroid hormon ve bu hormonların öncü maddelerini ihtiva etmektedir (Hartman ve ark., 1998). Bu hormonlar spermatozoanın fertilitesinde azalmaya neden olabilmektedir (Müller ve ark.,

2001). Buna karşılık Herold ve ark. (2004b), yumurta sarısı içermeyen bir sulandırıcı ile (AndroMed[®], Minitüb, Germany) yumurta sarısı içeren iki sulandırıcıyı (Triladyl[™], Minitüb, Almanya ve Red Ovine Freezing Buffer, IMV, Fransa) karşılaştırdıkları çalışmalarında, çözüm sonu progresif motilite değerleri AndroMed[®], Triladyl[™] ve Red Ovine Freezing Buffer için sırasıyla %13±13, %18±12 ve %28±16 bulmuşlardır.

Dondurma işlemi prosedürlerinin araştırıldığı bir çalışmada çözüm sonu progresif motilite değerleri standart protokol kullanılarak dondurma işlemi yapılan spermada %25 iken, 20°C/dk. ve 30°C/dk.'da soğutma işlemi uygulanarak dondurulan spermada ise bu değer %40 olarak bulunmuştur (Sukhato ve ark., 2001).

Yapılan bir çalışmada Tris-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcısı ile sulandırılan manda epididimal spermasında, ortalama %72,75 motilite oranı elde edilmişken, çözüm sonunda bu değer %51,58 olarak bulunmuştur (Hiron ve ark., 2006). Herold ve ark. (2006), Afrika mandasının epididimal spermasını dondurmaya amaçladıkları çalışmalarında, ticari Triladyl[™] ve AndroMed[®] sulandırıcıları ile elde ettikleri çözüm sonu sperma progresif motilite değerleri %17±11 ile %14±13 arasında değişkenlik göstermiştir. Yine Afrika mandalarında yapılan çalışmalarda epididimal spermanın, sperm-TALP (sperm-Tyroses's-albumin-lactat-pyrovate) ve Triladyl[™] (Minitub) sulandırıcıları ile dondurulduğu çalışmalarda %19-58 arasında çözüm sonu motilite değerleri saptanmıştır (Bartels ve ark., 1996; Lambrechts ve ark., 1999; Gerber ve ark., 2002).

Ticari Triladyl[™] ve AndroMed[®] sulandırıcılarına ek olarak %10'luk sığır seminal plazması katılarak elde edilen sulandırıcıların karşılaştırılmalı olarak epididimal spermanın dondurulmasının değerlendirildiği bir çalışmada, Triladyl[™], %10'luk sığır seminal plazması eklenmiş Triladyl[™], AndroMed[®] ve %10'luk sığır seminal plazması eklenmiş AndroMed[®] sulandırıcılarının taze sperma progresif motilite değerleri sırasıyla %21,6±12,77, %14±10,47, %32,3±19,01 ve %12,5±9,02 olarak belirlenmiştir (Herold ve ark., 2004a).

Kumar ve ark. (2008), tarafından dondurma sonrası akrozomal bütünlük ve ölü spermatozoa oranlarının belirlendiği bir çalışmada çözüm sonu %64,58±0,99 oranında akrozomal bütünlük ve %35,83±0,41 ölü spermatozoa verileri elde edilmiştir. Başka bir çalışmada çözüm sonu %66,83±1,05 akrozomal bütünlük ve %68,67±0,94 canlı spermatozoa oranları tespit edilmiştir (Hiron ve ark., 2006). Ticari sulandırıcılar olan

AndroMed® ve Triladyl™ sulandırıcılarının karşılaştırıldığı bir araştırmada çözüm sonu epididimal manda spermasında sırasıyla %54±6 ve %56±6 oranında akrozomal bütünlük tespit edilmiştir (Herold ve ark., 2006).

1.9. Manda Spermasının Dondurulması ve İdeal Protokoller

Manda spermasının suni tohumlama için işleme ve kullanma prosedürleri, sığır için geliştirilen tekniklerdeki yapılan bazı değişikliklere dayanmaktadır (Vale, 1997). Yapılan çalışmalarda dondurma amacıyla elde edilen manda spermasının laboratuvara getirildikten sonraki işleme prosedürleri aşağıdaki gibi gerçekleştirilmektedir:

- Uygun sulandırıcı ile tekli ya da ikili adımda spermanın sulandırılması (son konsantrasyon: $120-150 \times 10^6$ spermatozoa/ml).
- +5°C'deki spermanın 0,2-0,4°C/dk.'lık bir hızda soğutulması.
- Payet (0,25 ml) içinde paketlemesi.
- Tekli adımda yapılan sulandırmada 2 saat, ikili adımda yapılan sulandırmada 4-6 saatlik equilibrasyon.
- Varsa programlı dondurucuda, yoksa payetleri sıvı azotun 4 cm üzerinde sıvı azot buharında 10-20 dk.'da dondurma.
- Su banyosunda 37°C - 45°C'de 15-60 sn.'de çözdürme.

Zıt sonuçların da elde edildiği çeşitli sulandırıcılar ve çeşitli soğutma, dondurma ve çözdürme oranları zaman zaman kullanılmıştır. Bazı yazarlara göre, manda spermasının dondurulabilme kapasitesi zayıftır ve bu durum spermatozoon membranındaki düşük fosfolipit içeriği ve bu yapının donma-çözülme sırasında kaybı ile ilişkilidir (Sansone ve ark., 2000)

İdeal bir sulandırıcı: (i) pH'sı 6 ile 8 arasında; (ii) suda maksimum, diğer çözücülerde minimum çözülebilir; (iii) minimum tuz etkisine sahip; (iv) minimum solüsyon yoğunluğuna sahip; (v) sıcaklık etkisi en az değerde; (vi) zararsız katyon etkileşimine sahip; (vii) iyi bir iyonik dayanıklılıkta ve (viii) kimyasal stabiliteye sahip olmalıdır (Bates, 1961; Good ve ark., 1966; Good ve Izawa 1972; Keith ve Morrison 1981). Abdel-Malak ve ark. (1993), Tris sulandırıcısının 6,5 ila 8 arasındaki pH değerlerini denedikleri çalışmalarında, çözüm sonu motilite için 7,0 pH değerinin daha iyi sonuç verdiğini ortaya koymuşlardır.

Sulandırma oranı dondurma işleminin kritik aşamalarından biridir ve türden türe, kullanılan sulandırıcıdan sulandırıcıya göre değişiklik göstermektedir. Manda sperması için 1:1'den 1:12'ye kadar uygulanan sulandırma oranları başarıyla kullanılmıştır (Andrabi, 2009).

Sulandırıcılara katılan kriyoprotektif ajanlar dondurmanın olmazsa olmazıdır ve bu ajanlar hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki gruba ayrılır. Gliserol bu ajanların en başta geleni ve sıklıkla kullanımda olanıdır. Gliserol genellikle çoklu-hidroksillenme, su ile hidrojen bağı oluşturabilme ve hücre zarından nüfuz yeteneğine sahip olup, hücre tipi ve koşullarına bağlı olarak yaklaşık 1-5 mol/l arasındaki konsantrasyonunun hücrelere maruz kalması durumunda toksik değildir (Fuller ve Paynter, 2004). Dondurarak saklama sırasındaki gliserolün fizyolojik etkileri; hücresel hacmin korunması için gerekli hücre içi suyun yer değiştirilmesi, iyonlar ve makro moleküller ile etkileşim, suyun donma noktasının baskılanması ve donmamış kısımdaki elektrolit konsantrasyonlarının azaltılması sonucunda buz formlarının daha az oluşması ile sağlanmaktadır (Holt, 2000a; Medeiros ve ark., 2002). Yapılan araştırmalarla gliserolün sulandırıcılara hangi oranda (%6,5-7,0) katılması gerektiği belirlenmiştir. Kumar ve ark. (1992), manda sperması dondurma işleminde Tris-ve süt bazlı sulandırıcılar için en iyi gliserol oranının %6, sodyum sitrat sulandırıcısı için %9 olduğunu bulmuşlardır. Ramakrishnan ve Ariff (1994), Nastri ve ark. (1994) da %8'den %2-3'e kadar azalan konsantrasyonlardaki gliserol oranlarını denemişler ve %5'in altındaki gliserol oranlarının çözüm sonu motilite oranlarını ve spermatozoon akrozom bütünlüğünün korunmasını azalttığını tespit etmişlerdir. Abbas ve Andrabi (2002), farklı gliserol oranlarının (%2, %3, %4, %5, %6, %7, %8, %10 ve %12) etkilerini araştırdıkları çalışmalarında %7'lik gliserol oranının diğer kullanılan oranlara göre çözüm sonu motilite, canlılık ve plazma membran bütünlüğü üzerine daha olumlu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada Nehir mandası spermasının dondurulmasında Tris-yumurta sarısı sulandırıcısına %8 oranında gliserol ilavesi olumlu sonuçlar vermiştir (Koonjaenak ve ark., 2007). %6,5-7,0 oranında gliserol konsantrasyonuna sahip olan bir Tris-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcısı manda sperması dondurulması için en etkili sulandırıcı gibi görünmektedir (Mudgal, 1992).

Araştırmalar, yumurta sarısının manda sperması dondurulmasındaki gerekli oranının saptanması konusuna çok az önem verildiğini ve genellikle sperma

sulandırıcılarına %20'lik bir konsantrasyonda kullanıldığını ortaya koymaktadır (Sansone ve ark., 2000; Andrabi ve ark., 2008). Ayrıca yüksek bir konsantrasyonda yumurta sarısı kullanımının ölü spermatozoa toksisitesi (amino asit oksidaz aktivitesi) sonucu, çözüm sonu azalan motilite kalitesi gibi zararlı etkileri olabilmektedir (Shannon, 1972).

Hasan ve ark. (2001), Akhter ve ark. (2008), sulandırıcılara katılan nispeten yeni bir antibiyotik kombinasyonu olan gentamisin tilosin ve linco-spectin kombinasyonunun (GTLS) dondurulmuş spermatozoanın kalitesi ve bakteriyel kontaminasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmalarda toplam aerobik bakteri sayısı ve in vitro antibiyotik duyarlılığı bakımından yapılan değerlendirmeler sonucunda GTLS kombinasyonunun manda spermasında bakteri kontrolü için streptomisin ve penisilin kombinasyonundan daha etkili olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca, GTLS kombinasyonu manda spermatozoa canlılığı için zararlı değildir.

Spermatozoanın dondurarak saklama öncesinde kriyoprotektanlara maruz kalma süresinin çözüm sonu değerler üzerinde etkileri olduğu yaygın olarak bilinen bir gerçektir. Equilibrasyon; spermatozoanın dondurma işleminden önce gliserol ile temas halinde kaldığı toplam süredir. Bu zaman zarfında, gliserol dengeli bir hücre içi ve hücre dışı konsantrasyon oluşturmak için spermatozoonun içine nüfuz eder. Equilibrasyonun sadece gliserolün konsantrasyon dengesi ile olmadığı, aynı zamanda diğer ozmotik aktif sulandırıcı bileşenlerini de içerdiği göz ardı edilmemelidir (Salamon ve Maxwell, 2000). Bu nedenle equilibrasyon kullanılan sulandırıcı türünden (tampon ve kriyoprotektan) ve diğer kriyojenik prosedürlerden kolayca etkilenebilmektedir (Marshall, 1984). Bu bağlamda, Tuli ve ark. (1981), 2, 4 ve 6 saat boyunca Tris-sitrik asit bazlı sulandırıcı kullanarak sulandırılmış manda spermasının equilibrasyonunu inceledikleri araştırmada, çözüm sonu spermatozoon canlılığı açısından yapılan değerlendirmede 4 saatlik equilibrasyon süresinin 2 ve 6 saatlik equilibrasyon süresinden daha iyi sonuç verdiğini saptamışlardır. Herold ve ark. (2004b), ise 4-9 saat arasında değişen sürelerde equilibrasyon denemeleri ve farklılıklarının çözüm sonu sperma kalitesi üzerine bir etkisi olmadığı, daha kısa süredeki equilibrasyon sürelerinin ise zararlı olduğu sonucuna varmışlardır.

Hızlı soğutma spermatozoada enerji ve motilite kaybına neden olan fruktoz tüketimi, oksijen tüketimi ve ATP sentezi oranlarını azaltır (Blackshaw ve Salisbury,

1957; Wales ve White, 1959). Bhosrekar ve ark. (1994), manda sperması dondurma yöntemlerinde geleneksel (statik sıvı azot buharı üzerinde 10 dakika) ve kontrollü (programlanabilir) sistemi karşılaştırdıkları çalışmalarında, programlanabilir dondurucularla +4°C ve -40°C'deki sıcaklık aralığında 17,32°C/dk.'lık bir oranda yapılan dondurma işleminin geleneksel metottan daha iyi sonuç verdiğini saptamışlardır.

Hızlı çözündürme, spermatozoada herhangi bir hücre içi buz varlığının yeniden kristalleşmesini önlemek için gerekli bir işlemdir (Salamon ve Maxwell, 2000). Tris bazlı sulandırıcılarda dondurulan manda spermasının çözündürme işleminde iki farklı yöntem (37°C'de 30 saniye ve 75°C'de 9 saniye) deneyen Rao ve ark. (1986), en iyi sonucun 37°C'de 30 saniyede elde edildiğini saptamışlardır. Dhami ve ark. (1992), 60°C'de 15 saniye çözündürme işlemi ile diğer oranlara göre daha yüksek sperma motilitesi elde edildiğini bildirmiştir. Yine Dhami ve ark. (1996), 60°C'de 15 saniye çözündürme işlemi ile yüksek çözüm sonu spermatozoa kalitesi ve dayanıklılığı elde etmişlerdir.

Canlı hücrelerde oksidatif strese karşı hücre içi koruyucu mekanizmada önemli rol oynayan bir tripeptid bulunmaktadır. Hem birçok serbest radikal ile tepkimeye girebilen hem de toksik hidrojenperoksit ve hidroperoksitlerin indirgenmesini katalize eden glutation peroksidaz için kofaktör olarak rol oynayan bu tripeptit; Glutasyon (GSH); oksidatif strese karşı hücre içi koruyucu mekanizmada önemli görev almakta ve canlı hücreler içinde dağılmış bir halde bulunmaktadır (Bilodeau ve ark., 2001). GSH manda seminal plazmasında ve spermatozoasında bulunmaktadır (Jain ve Arora, 1988). Boğa sperması dondurulmasında yaygın olarak kullanılan yumurta sarısı tris gliserol sulandırıcısı (YSTG) ile sulandırma işlemi yapıldığında spermatozoon hücresi içerisindeki GSH'ın dışarı sızması ile miktarı azalmaktadır (Bilodeau ve ark., 2000). Boğalarda (Bilodeau ve ark., 2000), domuzlarda (Gadea ve ark., 2004) ve insanlarda (Molla ve ark., 2004) spermanın dondurulması ile spermatozoal glutasyon düzeylerinde azalma gözlemlendiği bildirilmiştir. YSTG ile yapılan sulandırma işlemi seminal plazmadaki GSH içeriğini azaltmakta ve bu miktar sulandırıcı tarafından kompanse edilememektedir. Bu azalma, hücre zarları yırtılması nedeniyle bir sızıntı veya oksidatif stres ile ilişkilendirilebilir.

Bioxcell® sulandırıcısı, GSH seviyeleri değerlendirildiğinde taze spermatozadaki değerleri dondurulmuş spermatozoada da koruma yeteneğine sahiptir ve bu yeteneğinin medium formülasyonunda mevcut olan antioksidanlar ile ilişkili olması muhtemeldir. Fakat IMV'nin tescilli bir ticari markası olan bu sulandırıcı için hiçbir moleküler yapı bilgisi mevcut değildir (Stradaioli ve ark., 2007). Dondurma ve çözündürme sulandırıcılarına GSH ilavesinin, boğalarda (Bilodeau ve ark., 2001; Foote ve ark., 2002) ve domuzlarda (Gadea ve ark., 2004; 2005) dondurulmuş sperma kalitesi ve motilitesini arttırdığı ve oksidatif hasara (Alvarez ve Storey, 1989) karşı spermatozoayı koruduğu gösterilmiştir (Bilodeau ve ark., 2001; Foote ve ark., 2002). Bioxcell® ile YSTG sulandırıcılarına GSH ilave edilen bir çalışmada çözüm sonu motilite ve canlılık değerlerinde Bioxcell® sulandırıcısı daha iyi sonuçlar verirken aynı zamanda sulandırıcılardaki çözüm sonu GSH değerleri ölçüldüğünde, Bioxcell® sulandırıcısında yaklaşık 3 kat daha fazla miktarda GSH bulunmuştur. Bioxcell® sulandırıcısı tris-yumurta sarısı sulandırıcısından daha yüksek konsantrasyonlarda (450 µmol'e 40 µmol) glutatyon içerdiğinden, sığır sperması dondurulmasında, spermada glutatyon içeriğini koruma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Stradaioli ve ark., 2007).

Sonuç olarak ticari Bioxcell® sulandırıcısı, laboratuvar ortamında hazırlanan YSTG sulandırıcısına göre çözüm sonu spermatozoa GSH seviyeleri, sperma motilitesi, canlılığı ve fonksiyonel parametreleri açısından daha iyi sonuçlar vermektedir (Stradaioli ve ark., 2007). Rutin olarak kullanılan tris-sitrik yumurta sarısı sulandırıcısına eşdeğer fertilitate sonuçları elde edilebilen Bioxcell®; kimyasal yapısı, kullanıma hazır oluşu ve en düşük hijyenik risklere sahip olması açısından avantajlara sahiptir. Bu ticari olarak temin edilebilen Bioxcell® sulandırıcısı tris-sitrik asit-yumurta sarısı sulandırıcı ile eşit verimlilik özelliğinde olduğu için manda spermasının dondurulması için kullanılabilir olduğu sonucuna varılmıştır (Akhter ve ark., 2010).

1.10. DNA Hasarı

DNA üzerinde çeşitli faktörlere bağlı olarak sürekli hasar oluşmaktadır. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne ve mutasyona neden olmaktadır (Halliwell ve Aruoma, 1991). Organizmada DNA hasarı ve onarımı arasında bir denge söz konusudur. Bu denge

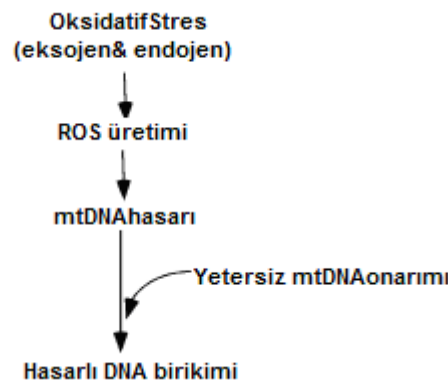
nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar sağlıklı hayvanlarda dahi saptanmaktadır. Yeni doğan sıçanlarda oksidatif baz modifikasyonunun olduğu gösterilmiştir (Randerath ve ark., 1997).

Spermatozoon DNA bütünlüğü embriyo, fetüs veya normal yavru gelişimi dahil olmak üzere doğal ya da yardımcı üreme teknikleri ile elde edilecek fertilizasyon başarısı için de önem teşkil etmektedir (Lopes ve ark., 1998b). Erkek genomunda anomaliler, fertilizasyon sonrası oluşacak başarısızlık için açık bir potansiyel nedenidir (Sakkas ve ark., 2002; Sergerie ve ark., 2005).

Kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, bazların kimyasal olarak değişmesi, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlaşmaları (Kopeika ve ark., 2004) gibi bir takım yapısal bozulmalar DNA'da ortaya çıkabilecek hasarların en önemlileridir.

1.11. DNA Hasarının Sebepleri

DNA çeşitli mutajenler tarafından hasara uğrayabilir, bunun sonucu olarak DNA dizisinde değişimler oluşabilir. Mutajenler arasında başlıca, alkilleyici etmenler, yükseltgen (oksidleyici) etmenler ve yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar (X ışınları ve morötesi ışık gibi) yer almaktadır. DNA'da oluşan hasarın tipi mutajenin tipine bağlıdır. Örneğin, mor ötesi ışık, timin dimerleri oluşturarak DNA'ya hasar verirken (Douki ve ark., 2003), serbest radikaller (SR) veya hidrojen peroksit gibi yükseltgen etmenler, baz değişimi (özellikle guanozin) ve çift iplikçikli kırılmalar gibi çeşitli türden hasar oluşturabilirler (Cadet ve ark., 1999). Oksidatif strese bağlı reactive oxygen species (ROS) üretimi sonucu DNA'da oluşan hasar birikimi Şekil 2'de verilmiştir (Burçak ve Ancidan, 2004).



Şekil 2. Oksidatif strese bağlı DNA'da oluşan hasar birikimi (Burçak ve Ancidan, 2004'dan uyarlanmıştır)

DNA'da kendiliğinden değişimler sonucu hasar oluşmaktadır. Bu hasarlar, DNA sentezi sırasında gözlenen bazların yanlış eşleşmesi (Osheroff ve ark., 1999), bazların kimyasal yapısında kendiliğinden meydana gelen değişimler (keto-enol tautomerizm ve deaminasyon) (Nguyen ve ark., 1992; Ohshima ve Barthsch, 1994; Friedberg ve ark., 1995; Esterhuizen ve ark., 2000), DNA yapısında bulunan pürin ve pirimidin bazlarının termal dayanıklılığına bağlı olarak hidrolitik baz kayıpları (Friedberg, 1995) şeklinde sıralanabilir.

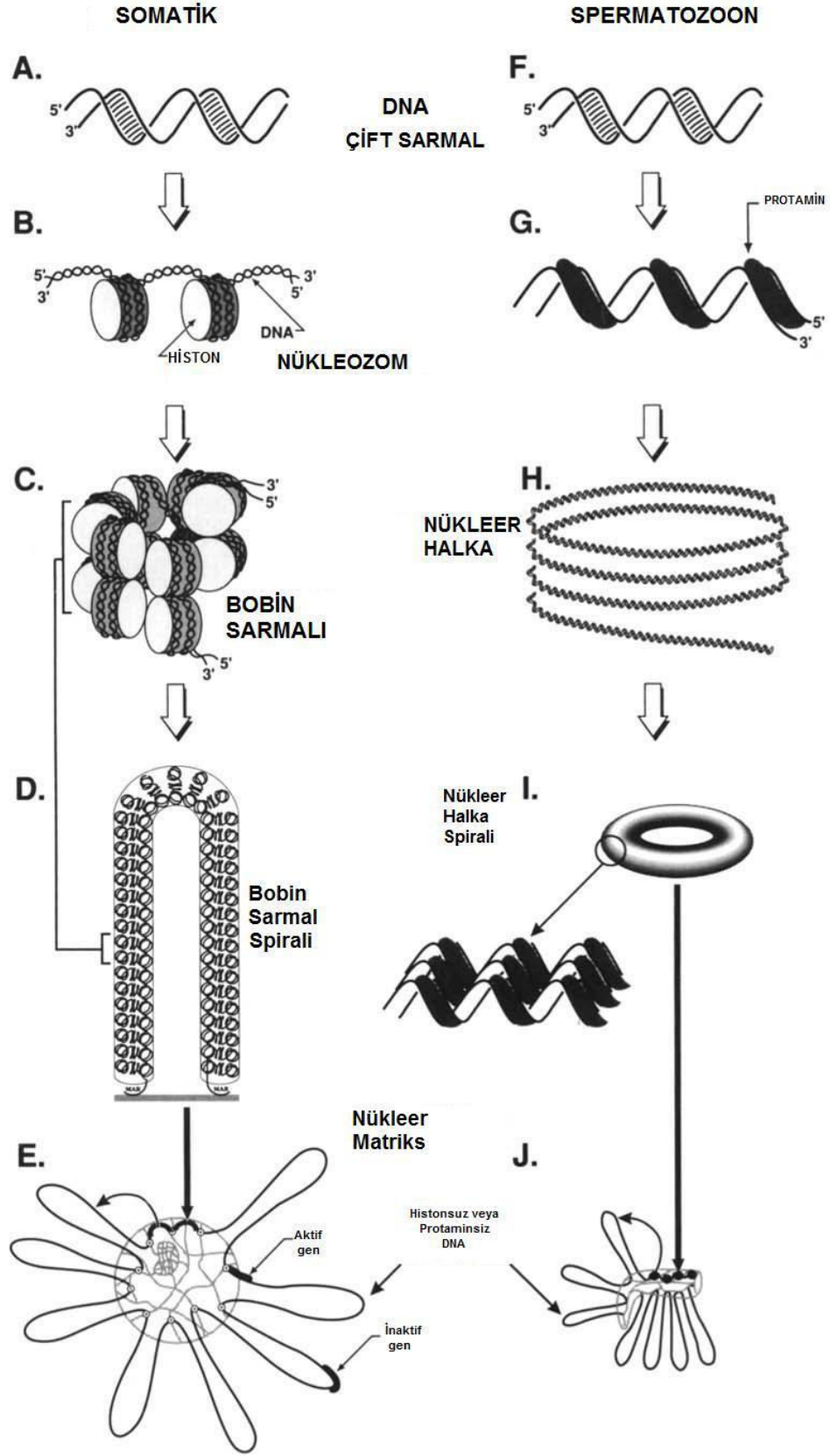
Bunun yanı sıra fizyolojik ve patolojik durumlarda oluşan SR, hücrel membran lipitleri, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrel yapılara zarar verirler. DNA hasarlarının bir kısmı SR tarafından meydana getirilir. SR, abazik alanlara baz modifikasyonlarına, tek veya çift dal kırıklarına, pürin ve pirimidin bazlarının spesifik modifikasyonuna, DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara ve DNA-protein çapraz bağlarının oluşumuna neden olur. Deoksiriboz iskeletinin oksidasyonu ile baz salınımı ve DNA zincir kırıkları indüklenirken, oksidatif baz modifikasyonları ise mutasyona yol açar (Nguyen ve ark., 1992; Friedberg ve ark., 1995).

DNA'da hasar oluşturan çevresel etmenlere; baz ve zincir kırıklarına sebep olan iyonize radyasyon (Ford ve Lavin, 1981; Cadet ve Berger, 1985 ; Janssen ve ark., 1993), pirimidin dimerleri oluşumu (Marmur ve Grossman, 1961) ile DNA çapraz bağları ve zincir kırıklarına sebep olan ultraviyole ışınları (Marmur ve Grossman, 1961; Rosenstain ve Ducore, 1983), çevresel mutajen ve karsinojenlerin en geniş grubu olan alkilleyici maddeler (Laval, 1990), DNA üzerinde zincir içi ve zincirler arası bağlar oluşturarak replikasyon ve transkripsiyon durduran çapraz bağlayıcılar (Friedberg, 1995) ve elektrofilik reaktanlarla metabolize edilen kimyasallar (Wells ve Winn, 1996) örnek olarak sayılabilir.

1.12. Spermatozoon DNA Yapısı

Somatik hücrede DNA, her dönüşünde 6 adet histonlu nükleozom içeren bobin spiralleri (selonit) halinde sıkıştırılmış olup 60000 baz çifti aralığında nükleer matrikse yapışık vaziyette bulunur. Aktif genler nükleer matrikse meyillidir. Spermatozoada histonlar protaminlerle yer değiştirir. Spermatozoon nükleusunda protaminler DNA'ya bağlıdır, onun negatif yükünü nötralize eder ve sıkı halkalar şeklinde kangallanır (Ward,

1993). Memelilerde spermatozoon nükleusu Şekil 3'te görüldüğü gibi nükleer halka denilen tek tip bir yapı içerir. Spermatozoon  ekirdeğinin DNA'sı bu halkaya demirlenmiŐ bir Şekilde bulunur. Spermatogenezis sırasında spermatozoona özel protaminler sayesinde DNA, nükleer histonların bir araya gelmesiyle sıkılaŐtırılmaktadır. Bu Şekilde sıkılaŐmıŐ DNA, protaminler üzerinde bulunan sülfidril gruplarının oksidasyonu sonucu Őekillenen disülfid bağlarının sayesinde bir arada tutunan kangallaŐmıŐ, ortası delikli  rek benzeri olan kromatin, bir spiral Őekildedir. Bu spiraller normal somatik hücrenin tipik bobin benzeri spiral DNA'sından çok daha dar bir yapıya sahiptir (Calvin ve Bedford, 1971; Cabrita ve ark., 2005). Spermatozoon DNA'sı somatik hücre DNA'sından 6 kat daha yoğun ve 40 kat daha az hacme sahiptir. Bu yoğun yapı ve DNA'nın Őesifik Őekli DNA ve protaminler arasındaki disülfid bağları ile sağlanmaktadır (Singh ve ark., 2003).



Şekil 3. Somatik hücre DNA ve spermatozoon DNA yapısı (Ward, 1993'ten uyarlanmıştır)

1.13. Spermatozoon DNA Hasarı ve Önemi

Spermatozoon DNA'sı fiziksel veya kimyasal denatürasyona son derece dayanıklıdır (Manicardi ve ark.,1995). Memeli spermatozoası ROS diye bilinen çeşitli reaktif oksijen türevlerini sınırlı miktarda üretir. Bu türevler spermatozoon gelişimi sırasında önemli fizyolojik rollere sahiptirler. Oksidatif strese bağlı artan ROS üretimi antioksidan müdafaa sistemini tahrip ederek fertilizasyon kapasitesinde azalma ve spermatozoon genom bütünlüğünde hasara neden olabilir (Said ve ark., 2005). ROS'tan başka reaktif nitrojen, klorin, bromin ve sülfür türleri de DNA'da hasar yapabilirler (Ünal, 2007).

ROS'un sebep olduğu DNA hasarı sonucu hücrelerin apoptozisi (programlı hücre ölümü) hızlanmaktadır. Bu durum spermatozoa sayısının azalması ile fertilité üzerine olumsuz bir etki yapmaktadır (Saleh ve ark., 2002).

İnsanlar (Sun ve ark., 1997) dahil, fareler (Ahmadi ve Ng, 1999), balıklar (Kopeika ve ark., 2004) ve istiridyelerde (Gwo ve ark., 2003) spermanın dondurularak saklanması DNA hasarına, bundan dolayı da anormal embriyo gelişimine ve infertiliteye neden olduğu belirtilmiştir. Hatta DNA'sı hasarlı olan spermatozoa embriyonik gelişimi olumsuz etkilemekle birlikte genetik hastalık riskini de artırmaktadır (Zini ve ark., 2001). Bu durumun tersine Guerin ve Benchaib (2004), spermatozoon DNA'sının kalitesi ile doğumdaki anomaliler arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını bildirmektedirler.

Oksidatif stresin, spermatozoon kromatin bütünlüğünü etkileyebildiği, tek ve çift iplikli DNA kırıklarına yüksek sıklıklarda neden olduğu gösterilmiştir (Aitken ve Krausz, 2001). Spermatozoanın yapay olarak üretilen ROS'a maruz kalması tüm bazları değiştirerek ve baz-free bölgeler, delesyon, DNA mutasyonu ve DNA çapraz bağları üreterek DNA hasarını önemli ölçüde arttırmaktadır (Duru ve ark., 2000). Anormal spermatozoon kromatin yapısının biyolojik etkisi, spermatozoondaki DNA veya kromatin hasarının ölçüsü ile bu hasarı onarmak için oosit kapasitesinin kombine etkilerine bağlıdır (Genesca ve ark., 1992). Bu nedenle, örneğin; in vitro fertilizasyon (IVF) işleminde kullanılacak olan spermatozoon örnekleri için DNA'sı yoğun hasara uğramış spermatozoa kullanılırsa, oosit onarım kapasitesi yüksek derecede oluşabilecek erken gebelik kaybını ve düşük orandaki embriyonik gelişimi önlemede yetersiz kalabilir (Ahmadi ve Ng, 1999). Haaf ve Ward (1995), spermatozoon kromatin

anomalilerinin embriyo gelişiminin erken aşamalarında paternal (babaya ait) gen aktivitesinin başlatılması ve düzenlenmesini etkileyebileceğini ileri sürmüşlerdir. Erkek genomunda kusurların fertilizasyon sonrası başarısızlığa yol açtığı saptanmıştır (Sakkas ve ark., 1999).

Fertilizasyon işleminde uygun süre boyunca dekondenzasyon (kromatin yapısının gevşemesi) kapasitesine sahip stabil DNA varlığı, fertil bir spermatozoon dikkate alındığında önemli kriterlerden biridir (Amann, 1989). Yapılan bazı çalışmalarda in vitro fertilizasyon ile spermatozoon DNA hasarı arasında negatif bir korelasyon olduğunu gösterilmiştir (Sun ve ark., 1997; Lopes ve ark., 1998b).

Birçok hücre kendi DNA'sındaki hasarlarla başa çıkabilecek çeşitli tamir mekanizmalarına sahiptir. Bu hasarlar tamir edilemediğinde kromozom bozuklukları görülmektedir. Birçok somatik hücredeki bu durumun tersine spermatidler ve spermatozoa bu kadar etkili tamir mekanizmalarına sahip değildir (Sega, 1974; Sega ve ark., 1978).

Matsuda ve Tohari (1989), fare spermatozoasının kimyasal ya da iyonize radyasyona maruz kalması ile oluşturulan DNA hasarının, spermatozoonun ovum sitoplazması içine girişi ve sonraki S fazının başlangıcı arasındaki dönemde döllenmiş yumurta içinde tamir edilebildiğini saptamışlardır. Ayrıca, asgari düzeydeki bazı hasarlar spermatozoon yumurtaya girdikten sonra kromozom düzenlemelerinde stabil hale gelir (Generoso ve ark., 1981; 1983).

Sıkı paketlenmemiş kromatin ve hasarlı DNA gibi anomalilerin kalitesiz sperma örneklerinde var olduğu bildirilmiştir (Sailer ve ark., 1995). Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, infertil donörlerden alınan motil spermatozoanın önemli bir bölümünün parçalanmış DNA içerdiği saptanmıştır (Sun ve ark., 1997; Lopes ve ark., 1998a). Kusurlu sperma fonksiyonunun memeli spermatozoasındaki lipid peroksidasyonunun indüksiyon ve yayılımı ile ilişkili olduğunu gösteren büyük kanıtlar vardır (Alvarez ve ark., 1987). Plazma membranında doymamış yağ asitlerinin yüksek miktarda olması ve glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi savunma enzimlerinin sınırlı bir kaynağına sahip oluşu, spermatozoonu oksidanlar tarafından oluşabilecek hasarlara karşı hassas hale getirmektedir (Jeulin ve ark., 1989; Zini ve ark., 1993).

Spermatozoon DNA bütünlüğü embriyonun, fötüsün ve yavrunun normal gelişimi de dahil olmak üzere doğal ya da yardımcı fertilizasyon tekniklerinin başarısı için önem arz etmektedir (Nandre, 2007).

1.14. Spermatozoon DNA Hasarını Etkileyen Faktörler

Spermatozoon DNA'sında oluşan hasarlar hayvanlardaki bireysel farklılıklara, çevresel etmenlere, spermanın işleme sürecine, hastalıklara vs. bağlı olarak şekillenmektedir.

1.14.1. Yaş

Spermatozoon DNA'sında hasar yaşlanma ile doğru orantılı olarak meydana gelmektedir. Bazı araştırmacılar fertil ve infertil erkeklerde spermatozoa motilitesi ile yaş arasında pozitif bir ilişkinin bulunduğunu, yaşa bağlı azalan spermatozoa motilitesi ve artan DNA hasarının muhtemelen sperma süspansiyonu içerisindeki lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen moleküllerinden kaynaklandığını ileri sürmektedirler (Aitken ve ark., 1998; Irvine ve ark., 2000). Singh ve ark. (2003), yaş ile spermadaki lökosit sayısı ve reaktif oksijen türleri arasında bir ilişkinin olmadığını, yaşın ilerlemesiyle spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasarların arttığını ve bu hasarlı hücrelerin eliminasyonunun da güçleştiğini bildirmektedirler.

1.14.2. Hormonlar

Nükleer yapı topluluğu ile testosteron düzeyi arasındaki ilişkinin mekanizması anlaşılmamış olmasına rağmen, düşük testosteron düzeyinin spermatozoon kromatin yapısında karışıklık ile birlikte olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda elde edilen ipuçları bu bulguları desteklemektedir. Folikül stimulan hormon (FSH) reseptörü defektli farelerde, spermatozoon kromatin defekti olan uzamış spermatozoa ve serum testosteron düzeyinde azalma saptanmıştır. Yine son zamanlarda yapılan bir çalışmada, testosteronun, spermatogenezis sırasında DNA kırılması ve bağlanması yapan bir enzim olan DNA topoizomeraz II ekspresyonunun pozitif düzenleyicisi olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Başar, 2005).

1.14.3. Varikosel

Varikoselin spermatozoondaki DNA hasarına nasıl yol açtığı henüz tam anlaşılmamasıyla birlikte Fujisawa ve ark. (1988), varikoselli hastaların testis dokusunda DNA polimeraz seviyesinde önemli bir azalma olduğunu ve bu enzimin eksikliğinin spermatogenezis üzerine olumsuz bir etki yaparak DNA hasarı meydana getirebileceğini ileri sürmüşlerdir. Varikoselli fertil veya infertil hastalarda yapılan araştırmalar seminal oksidatif strese bağlı yan ürün düzeyinde artma ve toplam antioksidan kapasitesinde azalmaların meydana geldiğini ortaya koymaktadır.

1.14.4. Mevsim

Mevsim faktörünün bataklik mandalarında spermatozoon üretimini etkilemediği (Sukhato ve ark., 1988; Koonjaenak ve ark., 2006) fakat plazma membran bütünlüğünü ve spermatozoon morfolojisini etkilediği bildirilmiştir (Koonjaenak ve ark., 2007). Tayland tropik koşulları altında ve mevsimsel sıcaklık ve nem değişiklikleri dikkate alındığında, bataklik manda sperması dondurulmasının kromatin bütünlüğü açısından ciddi bir hasar meydana getirmediği gözlenmiştir (Koonjaenak ve ark., 2007).

1.14.5. Genotoksik Maddeler

DNA'da mutasyona ve kötü huylu kansere yol açabilen genotoksikler hücre DNA'sında hasara yol açan maddelerdir. Spermatozoa DNA'sına genotoksik maddelerin verdiği hasarlarla ilgili pek çok araştırmada bu maddelerden vanadium (Leopardi ve ark., 2005), demir elementi (Muralidhara, 2005), kemoterapotik ajan olan cisplatin, acrylonitrile, tamoxifen, cyclophosphamide, styrene ve acrylamide gibi pek çok maddenin (Dearfield ve ark., 1988; Simula ve Priestly, 1992; Anderson ve ark., 1995, Pagano ve ark., 2001; Xu ve ark., 2003) spermatozoon DNA'sında hasara neden olduğu ortaya konmuştur.

1.14.6. Seminal Plazma

Oluşan oksidatif stres ürünlerinin yok edilmesinde veya oluşmasının önlenmesinde antioksidan maddeler çok gereklidir. Spermatozoon DNA'sı seminal plazmada antioksidan seviyesinin yüksek olması ile hasara karşı korunur. Bu nedenle antioksidanlar hem testisteki hem de fertilizasyon için ovuma doğru giden

spermatozoon DNA'sının bütünlüğünün sağlanması için taşınma süresince en uygun şartları sağlamaya yardımcı olabilir. Bunun tersine spermatozoanın antioksidanca yetersiz oluşu DNA hasarı ve apoptoziste artmaya yol açar. Seminal plazmada antioksidan seviyesi azaldığında oksidatif strese bağlı olarak DNA hasarı düzeyinde artış görülmektedir (Potts ve ark., 2000).

1.14.7. Spermanın Sulandırılması

Spermatozoon DNA hasarında spermanın sulandırılmasının etkisi ilgili hemen hemen hiç bilgi bulunmamakla birlikte Cabrita ve ark. (2005), alabalık ve çipuralarda yaptıkları çalışmada spermayı dondurmadan önce 1:6 ve 1:20 oranında sulandırdıklarında; oluşan DNA hasarı sırasıyla %28,2 ve %41,4 olarak tespit etmişlerdir. Sonuçta spermaya yüksek düzeyde sulandırıcı katılmasının DNA hasarını arttırdığı kanısına varmışlardır.

1.14.8. Spermanın Kısa Süreli Saklanması

Damızlık hayvanlardan alınan sperma uygun sulandırıcılarla ve uygun tekniklerle sulandırılarak buzdolabında (+4°C) 3-5 gün kısa süreli olarak saklanabilmektedir. Bu işlem, kısa süre içerisinde tohumlanacak hayvanların varlığında başvurulabilecek bir uygulamadır. Kısa süreli saklamanın spermatozoon DNA'sında hasar oluşturduğuna dair çok fazla bilgi olmamasıyla birlikte Boe-Hansen ve ark. (2004), domuz spermasını sulandırdıktan sonra 18°C de 5 gün saklamışlar ve 3. günün sonunda spermatozoa DNA hasarı indeksinde önemli artışların olduğunu bildirmişlerdir. Fraser ve Strzezek (2003), de domuz spermasını farklı sulandırıcılar kullanarak 5°C ve 16°C'de kısa süreli olarak sakladıklarında DNA hasarlarını sırasıyla %15,30 ve %12,45 olarak tespit etmişlerdir.

1.14.9. Spermanın Uzun Süreli Saklanması

Spermanın uzun süreli saklanması; kullanılan damızlık hayvanın spermasından daha uzun süre istifade edilmesi hatta damızlık ölse bile spermasının kullanılabilirliğinin sağlanması açısından oldukça önemlidir. Geyik, aygır, domuz ve balık gibi pek çok hayvan türünde ve insanlarda spermanın uzun süreli saklanması için yapılan işlemler esnasında spermatozoada DNA hasarının oluşup oluşmadığı ile ilgili

bir takım araştırmalar yapılmıştır. Yapılan alışmalar spermatozoanın dondurulup özdürülmesi sırasında DNA'sında hasarın oluştuğunu ortaya koymaktadır. Spermanın dondurularak saklanması işlemleri sırasında herhangi bir uygulama basamağında uygun olmayan bir işlemin yapılması, bu uygulamalar esnasında spermatozoon DNA'sında meydana gelebilecek muhtemel hasarın düzeyinde artışa sebep olacaktır (Türk ve ark., 2006). Dondurma öncesi spermatozoon DNA hasarı miktarı ile çözüm sonu canlılık arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, farklı DNA hasarı miktarlarına sahip spermatozoanın dondurulmasının, DNA hasarında önemli bir artışa yol açmadığı gözlenmiştir. DNA hasarlı spermatozoanın dondurulması DNA kalitesi bozmaz ancak spermatozoanın canlılık oranı tehlikeye girer (Kumar ve ark., 2009).

1.14.10. Kryoprotektanlar

Spermayı dondurarak saklama esnasında spermatozoonda oluşabilecek zararlı etkiler kryoprotektan maddeler kullanılarak azaltılabilmektedir. Kryoprotektanlar dondurma esnasında spermatozoonun baş kısmındaki intrasellüler bölüme geçerek sıvının donmasını ve buz kristallerinin oluşmasını seçici olarak engeller. Yapılan araştırmalar dondurma amacıyla spermaya kryoprotektanların katılmasının spermatozoon DNA'sında herhangi bir hasara neden olmadığını göstermektedir (Donnelly ve ark., 2001; Isachenko ve ark., 2004).

1.14.11. Serbest Radikallere Maruz Kalma

Reaktif oksijen molekülleri sınırlı seviyede olduğunda spermatozoanın kapasitasyonu sırasında fizyolojik role sahiptir. Ancak yüksek düzeyde reaktif oksijen moleküllerine maruz kalma spermatozoa DNA'sında hasara ve lipid peroksidasyona neden olmaktadır (Aitken, 1995; Potts ve ark., 2000). Baumber ve ark. (2003), aygır spermasındaki reaktif oksijen türevlerinin ve spermayı dondurarak saklamanın DNA hasarı üzerine etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada hidrojen peroksitin bu hasarda rolü olduğunu fakat süperoksit dismutazın herhangi bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada antioksidan olarak alfa-tokoferol (0,1 mM) kullanıldığında dondurmaya takiben oluşan DNA hasarının azaldığını tespit etmişlerdir. Birçok klinik çalışmada SR, spermatozoon DNA'sında hasar oluşmasının en önemli faktörlerden birisi olarak bildirmektedir. DNA yapısının bazı koruyucu mekanizmaları olmasına

rağmen plazma membranında yüksek miktarda doymuş yağ asitleri bulunması ve sitoplazmalarında düşük miktarda koruyucu enzimlerin olması nedeniyle spermatozoa SR'ye karşı oldukça duyarlıdırlar (Said ve ark., 2005). Çeşitli reaktif oksijen türevleri memelilerin spermatozoasında sınırlı miktarda üretilmektedir. Spermatozoon gelişimi sırasında önemli fizyolojik rollere sahip olan bu türevler, oksidatif strese bağlı olarak artması sonucu antioksidan müdafaa sistemini yıkıma uğratarak fertilizasyon kapasitesinde azalma ve spermatozoon genom bütünlüğünde bozukluklar ve hasara neden olabilir (Said ve ark., 2005). Bu ROS türevlerinden başka reaktif nitrojen, klorin, bromin ve sülfür türleri de DNA'ya saldırarak hasar yapabilirler (Sawa ve ark., 2006). Reaktif nitrojen türleri; örn: peroksinitrit ve nitrojen oksit, DNA hasarı yapabilirler (Brown ve Borutaite, 2001). Peroksinitritin guanin ile reaksiyonu sonucu 8-nitroguanin oluşturur. Bu oluşumdan dolayı G≡C, A=T ile yer değiştirebilir. DNA'da bu lezyonun stabilitesi kısa süreli iken RNA'da bu nitrojen bağlanması stabildir (Valko ve ark., 2006). Reaktif klorin türleri klorinat sitozin ve adenin oluşturabilirler. Reaktif türler lipid ve proteinleri etkileyerek DNA hasarını daha da kötüye götürebilirler. Yapılan bir çalışma kriyoprezervasyonun manda spermatozoasında DNA hasarının derecesini etkilemediği iddia etmektedir. Bu çalışmada ROS üretiminden kaynaklanan hasarın sadece sperma motilitesi ve foksasyonlar üzerinde önemi olup ve sadece minor derecede etkisi olduğu aktarılmaktadır. Bir dizi çalışma +4°C'de (Vishwanath ve Shannon, 2000) veya dondurarak saklama (Chatterjee ve Gagnon, 2001) işlemleri sonucu oluşan spermatozoadaki kusurlu fonksiyonların nedenlerinden biri olarak membran lipid peroksidasyonunu göstermiştir. Birçok biyokimyasal veya mekanik faktörün spermatozoa tarafından ROS üretimini teşvik ettiği saptanmıştır (Aitken ve Clarkson, 1988).

1.15. Spermatozoon DNA Hasarının Embriyo Üzerine Etkisi

Embriyonik gelişimin önemli bir şartı fertilizasyon sonrası (Spano ve ark., 2000), normal embriyonik gelişim için bir ön koşul olan sağlam nükleer DNA'da kromatinlerin dekonduksiyon yeteneğidir (Aravindan ve ark., 1997; Anzar ve ark., 2002). ROS tarafından oluşan spermatozoon DNA hasarının, fertilizasyon sonrası gelişim üzerinde ciddi sonuçlarının var olduğu bildirilmiştir (Aitken ve ark., 1998). Yapılan bir çalışmada DNA'sı hasarlı sperma ile sağlam DNA'lı spermanın aynı oranda

oosit dölleyebildiği saptanmıştır. Fakat embriyonik gelişim DNA hasarı derecesinin artmasına bağlı olarak önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca oosit belli bir seviyeye kadar spermatozoon DNA hasarını tamir etme kapasitesine sahiptir. Bu düzeyin ötesindeki hasarlar embriyonun parçalanmasına ve düşük embriyonik gelişim oranına neden olur (Ahmadi ve Ng, 1999). Yapılan in vitro çalışmalarda DNA bütünlüğü zayıf olan spermatozoonun fertilizasyon kapasitesinin etkilendiğine (Lopes ve ark., 1998b) ve etkilenmediğine (Twigg ve ark., 1998) dair sonuçlar mevcuttur.

1.16. DNA Tamir Mekanizmaları

Transkripsiyon, replikasyon gibi temel biyolojik olayların DNA tamiri ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğu ortaya konulmuştur. DNA tamir yollarındaki hasarlar, DNA hasarına neden olan ajanlara karşı duyarlılık gösteren genetik hastalıkların moleküler temelini anlaşılmasını sağlamaktadır (Kılıç, 2004).

Gen terapisinde genleri hücrelere taşıma amacıyla kullanılan ve genetik olarak zararsız hale getirilmiş virüslere vektör denmektedir. Günümüzde yapılan araştırmalarda, virüslerin hastalığa yol açan gen parçalarının yerine, hastaları iyileştirme amacıyla rekombinant genler yerleştirilmektedir. Bu şekilde değiştirilmiş virüsler hücreye girmek için kendi yöntemlerini kullanırlar ve genomlarının ekspresyonu sonucu, genin kodladığı protein üretilmeye başlanır. Öte yandan virüsün kendisini çoğaltmak için ihtiyaç duyduğu genler, tedavi edici genlerle değiştirilmiş olduğundan, virüs çoğalıp hücreyi patlatamaz (Eming ve ark., 1997). In vitro çalışmalarla rekombinant retrovirus aracılığıyla defektif DNA onarımının düzeldiği gösterilmiştir (Kılıç, 2004).

Canlı organizmalar, genetik materyalin bütünlüğünü korumak için nükleotid kesip çıkarma onarımı olarak bilinen nükleotid eksizyon tamiri (NER) ve baz kesip çıkarma onarımı olarak bilinen baz eksizyon tamiri (BER) gibi çeşitli DNA tamir mekanizmalarına sahiptirler. Ultraviyole ışınların neden olduğu siklobütan pirimidin dimerleri gibi çeşitli DNA hasarları NER mekanizması ile, oksidatif hasarlar ise BER mekanizması ile tamir edilmektedir. Transkripsiyonel olarak aktif genlerin tamirinden sorumlu transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizması, NER mekanizmasının bir alt yoludur (Meltem, 2003).

DNA'da yanlış eşleşmiş, okside olmuş, deamine olmuş ve karsinojenler ile katılma ürünü oluşturmuş bazların onarımında başlıca 4 mekanizma vardır (Meltem, 2003). Bunlar; baz çıkararak onarım, nükleotid çıkararak onarım, yanlış eşleşme onarımı ve doğrudan onarım olarak sıralanabilir (Shigenaga ve ark.,1989; Fraga ve ark., 1990; Shigenaga ve Ames, 1991).

1.17. Spermatozoon DNA Hasarı Tespit Metotları

Günümüzde yaygın olarak DNA parçalanmasının değerlendirilmesinde single cell gel electrophoresis (Comet), flow cytometric terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein dUTP nick-end labeling (Tunel), sperm chromatin structure assay (SCSA) analizleri kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2004). Bunun yanında in situ translyasyon analizi, akridin oranj (metakromik boya) boyama, spermatozoon kromatin dispersiyon testi, elektron mikroskop, enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA), fluorescein in situ hybridization (FISH) ve likit kromatografi kullanılmaktadır (Floyd ve ark., 1986; Agarwal ve Said, 2003; Fernandez ve ark., 2003). Ayrıca DNA yapısını belirlemede kullanılacak anilin mavi ve metil yeşil, giemsa CMA3 gibi boya yöntemleri de bulunmaktadır (Esterhuizen ve ark., 2000). Bu bölümde yukarıdaki metotlardan en çok kullanılanlar açıklanmıştır.

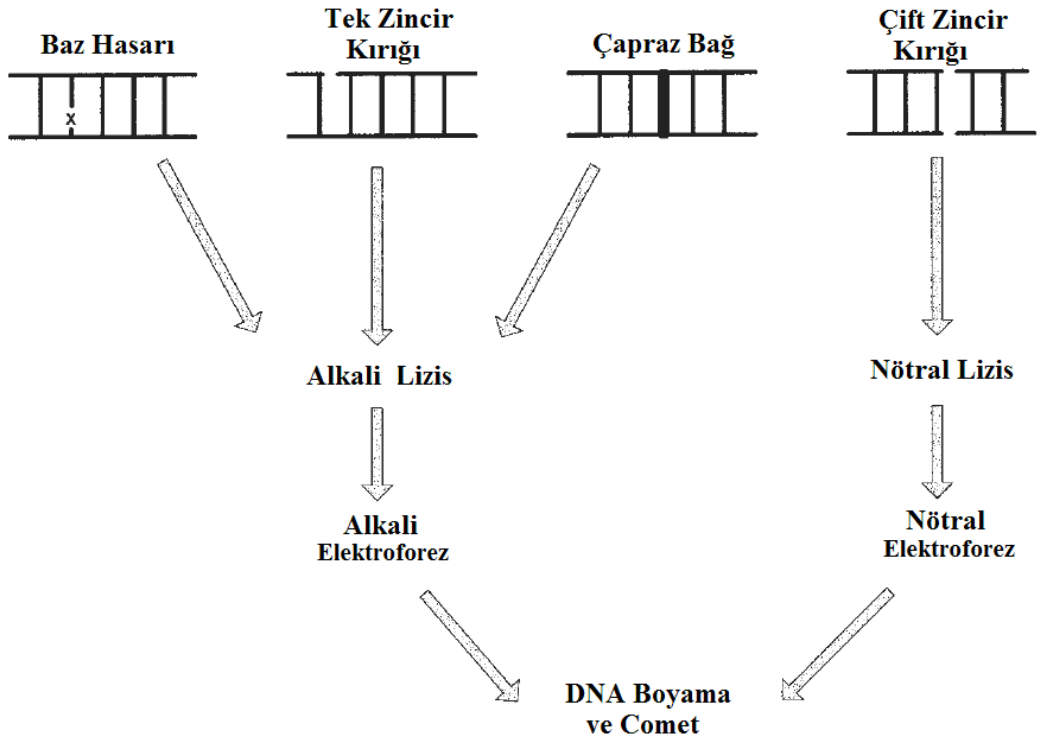
1.17.1. Tek Hücre Jel Elektrofrez (Comet) Testi

Comet testi somatik hücrelerde genotoksik hasarı ve özellikle tek ve çift zincir kırılmalarını ölçmek için yaygın bir şekilde kullanılır (Singh ve ark., 1989). Hücrelerin DNA hasarını tespit etmede basit, hızlı, ucuz, esnek ve en önemlisi de duyarlı bir yöntem olan (Collins, 2008; McKenna ve ark., 2008; Tice ve ark., 2008) Comet testi, mikroskop kullanılarak hücrelerdeki DNA zincir kırılmasını görselleştirmek ve ölçmek için kullanılan bir jel elektrofrez yöntemidir (Olive, 2002).

Hücresel lizis ile DNA tespit kavramına ilk defa 1970'lerde başlanmıştır. Comet testi günümüzde DNA hasarını tespit etmek için biyoloji bilimlerinin farklı alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Collins, 2008).

Son yirmi yılda, DNA hasarını değerlendirebilmek için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Rydberg ve Johanson (1978), slaytlar üzerinde agar içine gömülüp lize edilen hücrelerin hafif alkali koşullar altında DNA'sının kısmi gevşemesine izin veren

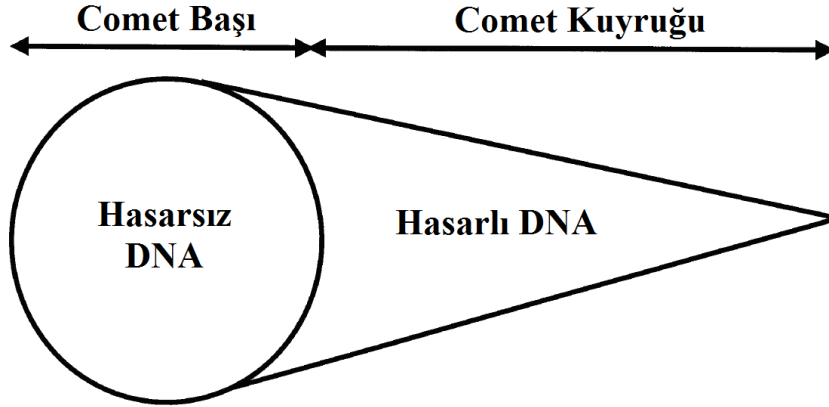
bir metot ile DNA hasarını doğrudan ölçen ilk araştırmacılar. Nötralizasyon sonrası DNA hasarının derecesi hücrelerin akrinin turuncu boyası ile boyanarak tespit edilmiştir. İzole hücrelerde DNA hasarı tespiti için duyarlılığı artırmak amacıyla, Ostling ve Johanson (1984), Comet testi olarak bilinen bir mikrojel elektroforez tekniği geliştirdi. Bu teknikte agaroz jel içerisine gömülü hücreler bir lam üzerine yerleştirilip, deterjan ve yüksek miktarda tuzla muamele edilerek lize edildikten sonra serbest kalan DNA nötr koşullar (pH: 9,5) altında elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra bir floresan boya (etidyum bromür) ile boyanan DNA, baş ve kuyruk ile bir kuyruklu yıldız benzetilmiştir. Ancak bu teknik sadece çift zincirli DNA kırıklarının tespitine izin vermiş ve radyasyon ve radyomimetik kimyasallar içeren çalışmalara bir sınır oluşturabilmesi nedeniyle RNA varlığı potansiyel artefaklara yol açmıştır (Tice ve ark., 1991; Tice ve Strauss, 1995; Klaude ve ark., 1996). Comet testinin iki farklı versiyonu günümüzde kullanımdadır. Comet yönteminin bugünkü mevcut ve en sık kullanılan hali Singh ve ark. tarafından 1998 yılında geliştirilmiştir (Tice ve ark., 1991). Singh ve ark. (1988), hücrelerdeki tek zincir kırıklarını ve alkali labil bölgeleri saptama kapasitesine sahip, X-ışınları ya da hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulamasından sonra DNA hasarını analiz etmek için alkali elektroforez (pH: 13) kullanmışlardır. Bunu takiben, alkali ortamdaki lizis sonrası nötral (Olive ve ark., 1990a) ya da hafif alkali (pH 12.3) koşullarda (Olive ve ark., 1990b) elektroforez ile tek zincir kırılmalarını tespit etmek için Olive ve ark. (1990), Ostling ve Johanson'un (1984) nötral tekniğinin bir farklı versiyonunu geliştirmiştir (Rojas ve ark., 1999). 1998 yılından beri, testin duyarlılığını arttırmak için birçok modifikasyonlar ortaya konmuştur (Tice ve ark., 1991; Tice ve Strauss, 1995). Birçok araştırmacı "Comet testi" olarak bu yöntemi tercih etmesine rağmen bu versiyon "tek hücre jel elektroforezi (SCGE) tekniği" olarak bilinmektedir. DNA'da oluşan hasarların Comet testi ile tespiti Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. DNA’da oluşan hasarların Comet testi ile tespiti (Olive, 2002’den uyarlanmıştır)

Comet pahalı olmamasının yanında, hassas ve DNA hasarı belirlenmesinde güvenilirliği olan bir yöntemdir (Morris ve ark., 2002). Bazı çalışmalara göre spermatozoon DNA kırıklarının incelenmesinde SCSA ve TUNEL’e göre daha duyarlı bir analiz yöntemidir. Ayrıca Comet, Çin hamster yumurta hücrelerinde apoptozisin erken dönemindeki DNA parçalanmasının belirlenmesinde flow sitometriden daha duyarlıdır (Donnelly ve ark., 2000). Morris ve ark. (2002), 60 infertil çift üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada Comet testi ile DNA hasarı tespit edilen spermaların fertilizasyon ve gebelik oranları incelenmiş ve bu grupta altı gebelik yakalanmasına karşın canlı doğum gerçekleşmemiştir. Bu durum testin güvenilir oluşunu ispatlar yöndedir. Aynı çalışmada toplamda ise, altmış çiftin 15’inde gebelik ve 12 canlı doğum olmuştur. Donnelly ve ark. (2000), yapmış olduğu çalışmada, donma öncesi ve sonrası fertil ve infertil erkeklerin ejakülat spermasının DNA hasarının Comet ve TUNEL sonuçları arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Aravindan ve ark. (1997), 23 infertil erkeğin semeninde TUNEL, SCSA ve Comet ile spermatozoon DNA’sı değerlendirmiş ve bu üç yöntem sonuçları arasında korelasyon olduğunu saptamışlardır.

Lizis ve elektroforezisin pH koşullarına bağlı olarak bu tekniğin hassasiyeti değişebilmektedir. Her iki değişken için nötral koşulların kullanılması, DNA çift zincir kırılmalarının tespitine olanak tanır. pH: 12,3 olduğunda tek zincir kırılmaları ve DNA onarım bölgelerindeki gecikmeler tespit edilirken, pH: 13'te bunlara ek olarak alkali labil bölgelerde değerlendirilebilmektedir (Rojas ve ark., 1999). Comet testinde elde edilen kuyruklu yıldızı görüntüsü Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. Şematize Comet kuyruklu yıldızı görüntüsü (Steele ve ark., 1999'dan uyarlanmıştır)

DNA hasarını saptamadaki yüksek sensitivitesi, çok çeşitli ökaryotik hücrelerde çalışılabilir olması, az hücre sayısında da çalışılabilmesi Comet yönteminin avantajlarıdır. DNA hasarına yol açan ajanların erken biyolojik etkilerini belirlemede yararlıdır. Comet yönteminde; zaman, sıcaklık, ışık gibi faktörler DNA'da hasara neden olabileceğinden hücreler en kısa sürede soğukta ve ışıktan korunarak çalışılmalıdır (Abdulkerim ve ark., 2005). Yöntemin popülaritesi büyük ölçüde, tekil dağılımlı hücrelerin her popülasyonunda DNA hasarını ölçebilme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. Bir damla kan, bir erken embriyo (Takahashi ve ark., 1999) ya da bir tümörün ince bir enjektör ile aspirasyon biyopsisi (Olive ve ark., 1996) analiz için yeterli hücre sağlamaktadır. Hücrelerin tek tek tepkisini tanımlar olması bu yöntemin benzersiz bir özelliğidir. Böylece bilgi, bir hücre popülasyonu içindeki DNA hasarı veya tamirinde farklı biçimlerde elde edilebilir. DNA hasarını değerlendirmede yüksek sensitivitesi, az sayıda hücrelerle de çalışılabilmesi, farklı ve çok çeşitli ökaryotik hücrelerde çalışılabilir olması Comet yönteminin avantajlarıdır (Bedir ve ark., 2004).

1.17.2. Tunel Testi

Bu testin hasarlı spermatozoada apoptozisin göstergesi olduğu bilinmektedir. TUNEL tekniği apoptotik olduğuna inanılan semendeki spermatozoon popülasyonunun tanımlanması için ilk defa Gorczyca ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır (Gorczyca ve ark., 1993). Bu yöntemde, DNA kırıklarının 3'-OH ucu reaksiyonunu katalizleyen eksojen terminal deoksinukleotidiltransferaz (TdT) enzimi bağlanarak işaretlenir ve bu kısma (tek ve çift DNA zincir kırıkları) uridin trifosfat (dUTP) bağlanarak biotinlenir. Biotinlenmiş DNA streptavidin ile birleşerek suda çözünmeyen renkli bir ürün ortaya çıkarır (Agarwal ve Said, 2003).

1.17.3. Spermatozoon Kromatin Yapısı Testi (SCSA)

Bu yöntem ile dakikada binlerce spermatozoonun değerlendirmesine imkan veren bir cihaz olan flow sitometri sayesinde in vitro (Maxwell ve ark., 1998) ve in vivo (Ericsson ve ark., 1993; Januskauskas ve ark., 2001, 2003; Anzar ve ark., 2002; Gillan ve ark., 2005) fertilitedeki korelasyonun belirlenmesi ve sperma değerlendirmedeki nesnelliğin artırılması (Graham, 2001) mümkündür.

Evenson ve ark. (1980), tarafından geliştirilmiş olan bu yöntemde, spermatozoon nükleer kromatini içerisinde devamlılığını sürdüren normal DNA yapısını (çift-sarmallı DNA) ve in situ asit denatürasyonuna spermatozoon DNA'sının duyarlılığını ölçmek için flow sitometri kullanılır. SCSA, flowsitometrik bir yöntemdir (Agarwal ve Said, 2003). Bu yöntemle denatüre olan DNA ısı veya asit ile muamele edildikten sonra metakromik bir boya olan akridin oranj ile çift zincirli DNA kelat oluşturması ile (Evenson ve ark., 2002) tek sarmallı DNA'ların (tek sarmallı DNA'lar \geq 630 nm'de kırmızı floresan renk verir) çift sarmallı (çift sarmallı DNA'lar 515-530 nm'de yeşil floresan renk verir) olanlara oranı ölçülür. Tek sarmallı DNA/çift sarmallı DNA oranında artış daha fazla denatürasyon ve kromatin yapısında daha fazla kırılabilirlik olduğunu gösterir (Sailer ve ark., 1995).

1.17.4. In Situ Translasyon Ölçümü

DNA polimeraz I enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonda dUTP tek DNA zinciri ile birleşir (Manicardi ve ark., 1995). Klinik olarak kullanımı kısıtlıdır ve in vitro fertilizasyon sonuçları ile in situ translasyon sonuçları arasında korelasyon

bulunmamaktadır. In situ translasyon yöntemi ile yapılan nükleer bütünlük değerlendirmesindeki sonuçlar ile spermatozoa konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi arasında net bir ilişki olduğu görülmüştür (Irvine ve ark., 2000).

1.17.5. Akridin Oranj Boyama

SCSA'nın basitleştirilmiş şeklidir. Pahalı olmayan ve iyi yetişmiş bir teknisyene gereksinim duyulmayan bir yöntemdir. Acridine orange (AO) testinde, spermatozoanın yorumlanması ve mikroskopik incelenmesi sırasında renklerin çabuk solması, heterojen boyanmanın görüntüyü kötüleştirilmesi güçlük yaratmaktadır. Bazı laboratuvarlar AO testini erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde kullanmaktaysa da, alınan neticeler tartışmalıdır. Buna rağmen bu yöntemin klinik önemi AO test ile TUNEL sonuçları arasında pozitif bir korelasyon olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca spermatozoa motilitesi ve AO testi arasında negatif bir korelasyon da vardır (Sakkas ve ark., 2002).

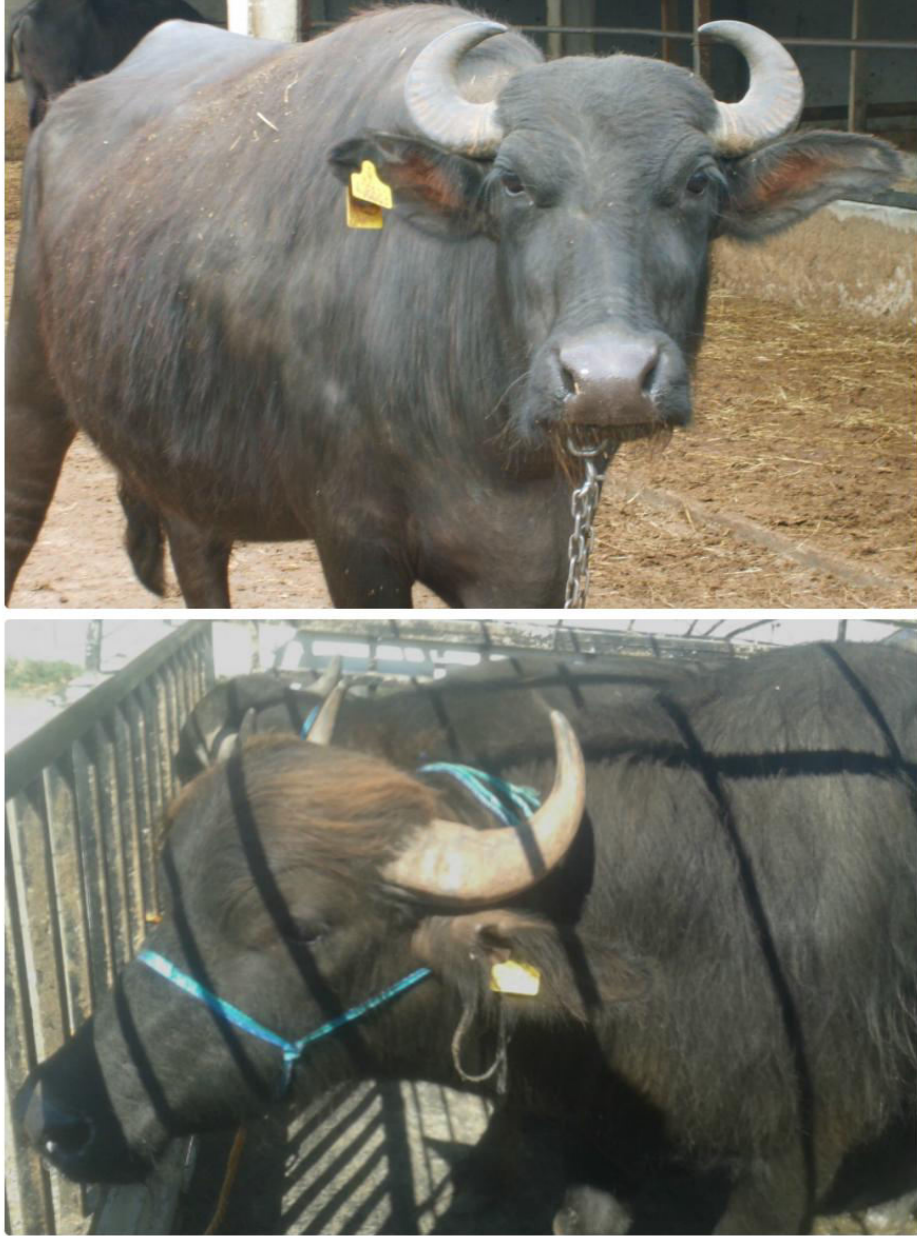
1.17.6. Spermatozoa Kromatin Dispersiyon Testi

Son zamanlarda tanımlanan bu yöntem, DNA fragmentasyonu için basit ve pahalı olmayan bir tekniktir. Testin temeli, kırık zincirli DNA'ya sahip spermatozoanın asit denatürasyonu sonrası ve nükleer proteinlerin açığa çıkmasını takiben aquase agarozda karakteristik bir halo vermesidir. Oluşan bu halonun küçüklüğü veya yokluğu yoğun DNA fragmentasyonunu gösterir (Sakkas ve ark., 2002).

Yapılan bu çalışmanın amacı, mezbahanelerden kesim sonrası alınan manda testislerinden elde edilen epididimal spermalarda dondurmanın spermatozoon DNA hasarı ve bazı spermatolojik parametreler üzerine etkisinin dondurma öncesi ve sonrası karşılaştırılması olarak incelenmesidir.

2. MATERYAL ve METOT

Çeşitli mezbahanelerden kesim sonrası alınan 50 adet Anadolu mandası (3 yaş ve üzeri) (Şekil 6) testisleri çalışmanın materyal bölümünü oluşturdu.



Şekil 6. Anadolu mandası

2.1. Testislerin Alınması

Mezbahada kesilen mandaların testisleri Lambrechts ve ark. (1999)'nın bildirdiği gibi kesimin hemen sonrasında scrotumunun bir bıçak yardımıyla kesilip

açılması ile dışarı çıkarıldıktan sonra spermatik kord'dan kesilerek epididimislerle birlikte alındı (Şekil 7).



Şekil 7. Testislerin alınması

2.2. Testislerin Laboratuara Getirilmesi

Alınan testisler, içerisinde +4 °C'yi sağlayacak buz kalıpları bulunan kapalı bir kaba konularak kesimden sonraki 30 dakika içinde laboratuara ulaştırıldı (Şekil 8) ve

bunu takiben en geç 4 saat içinde spermanın elde edilmesi ve işlenmesi tamamlandı (Lambrechts ve ark., 1999).



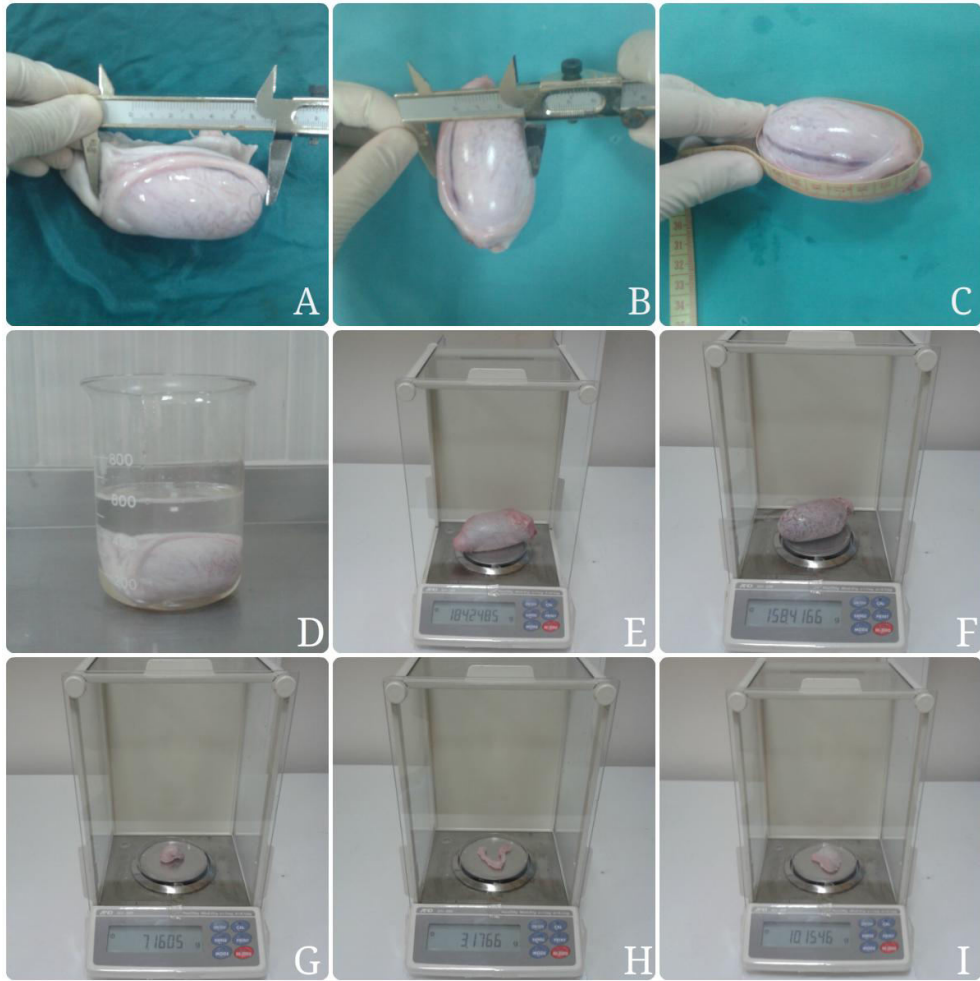
Şekil 8. Testislerin laboratuara ulaştırılması. A-B: Sıcaklığı muhafaza eden kap. C-D: Testislerin kap içerisine buz konularak getirilmesi

2.3. Testis ve Epididimisin Morfometrik Ölçülerinin Alınması

Spermanın elde edilmesi işlemi öncesinde testislerin boy, en ve çevre uzunlukları kumpas ve mezür yardımıyla, testis-epididimisin toplam hacmi içerisine su konulmuş hacim ölçmeye yarayan beher yardımıyla, testis, caput epididimisin, corpus epididimisin ve cauda epididimisin ağırlıkları hassas terazi yardımıyla ölçüldü (Şekil 9, 10) (Tekin, 1994).



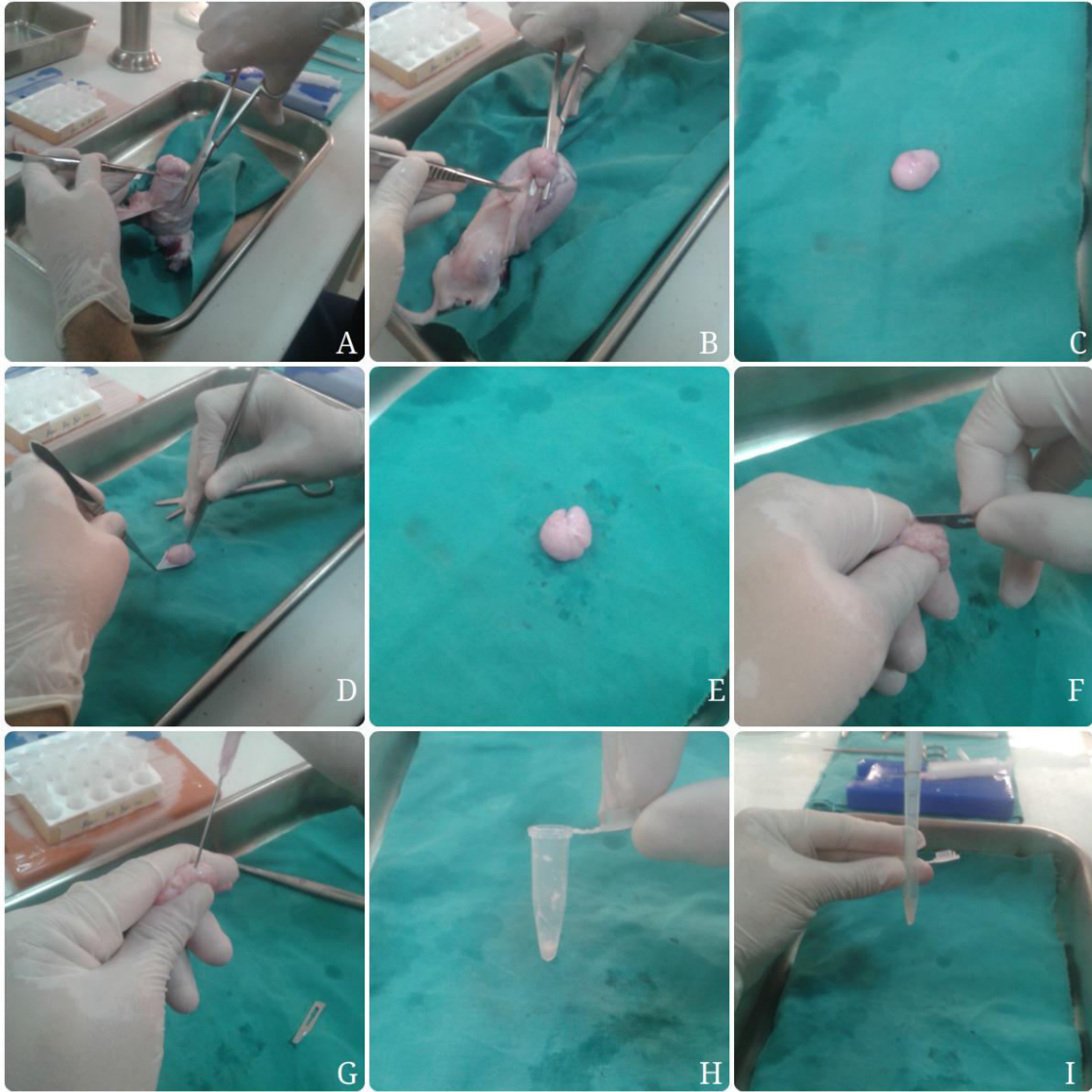
Şekil 9. A: Kullanılan ekipmanlar, B: Laboratuvarva getirilen testisler



Şekil 10. Testis ve epididimisin morfometrik ölçülerinin alınması. A: Testisin boy uzunluğunun kumpas yardımıyla ölçülmesi, B: Testisin en uzunluğunun kumpas yardımıyla ölçülmesi, C: Testisin çevre uzunluğunun mezur yardımıyla ölçülmesi, D: Testis-epididimis toplam hacminin içerisinde su konulmuş hacim ölçmeye yarayan beher yardımıyla ölçülmesi, E: Testis (toplam) ağırlığının hassas terazi yardımıyla ölçülmesi, F: Testis ağırlığının hassas terazi yardımıyla ölçülmesi, G: Cauda epididimis ağırlığının hassas terazi yardımıyla ölçülmesi, H: Corpus epididimis ağırlığının hassas terazi yardımıyla ölçülmesi, I: Caput epididimis ağırlığının hassas terazi yardımıyla ölçülmesi

2.4. Spermanın Elde Edilmesi

Laboratuara getirilen testislerden epididimisler ayrıldı, steril bir bistüri yardımıyla cauda epididimis üzerine kesit atılarak, ductus epididimiste bulunan spermanın dışarı çıkması sağlandı. Daha sonra dışarı sızan sperma steril bir enjektör yardımıyla çekilerek elde edildi (Şekil 11) (Patrizio ve ark., 1988). Elde edilen sperma ikiye ayrılıp bir bölümü çalışmanın kontrol grubunu (taze sperma), diğer bölümü deneme grubunu (dondurulmuş sperma) oluşturdu ve her iki grup örnekleri spermatolojik muayeneler ve spermatozoon DNA hasarı yönünden incelendi. Kontrol grubu spermaları ticari Bioxcell® (IMV Technologies, L'Aigle, France) sulandırıcısı ile sulandırıldıktan sonra spermatolojik muayeneleri yapıldı ve ardından DNA hasarı yönünden incelendi. Deneme grubu spermaları da yine Bioxcell® sulandırıcısı ile sulandırıldıktan sonra donduruldu. Daha sonra dondurulan spermalar en az 24 saat sıvı azotta (-196°C) saklandıktan sonra 37°C'deki su banyosunda 25-30 saniye bekletilerek çözdürüldü ve ardından spermatolojik parametreler ve spermatozoon DNA hasarı yönünden tekrar incelendi.



Şekil 11. Spermın elde edilmesi. A, B, C, D ve E: Cauda epididisin testisten ayrılması, F, G ve H: Cauda epididimisten siteril bistüri ve enektör yardımıyla spermın elde edilmesi, I: Elde edilen spermın sulandırılması

2.5. Kontrol Grubu (Taze Sperma) Muayeneleri

2.5.1. Taze Spermada Spermatojik Muayeneler

Spermatojik muayenelerden spermatozoa progresif motilitesi (%) Sharma ve ark. (2012)'na göre, spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^6$ sp/ml), ölü/canlı spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (%) Tekin (1994)'in yöntemlerine göre saptandı.

Progresif Motilite Muayenesi

Muayene ısıtma tablalı, faz-kontrast mikroskop kullanılarak yapıldı ve yüzde olarak belirlendi. Spermadan küçük bir damla alınarak ısıtma tablalı ve ısısı 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 ölçülmesi ile ortalaması alınarak yüzde olarak saptandı.

Spermatozoa Yoğunluğu

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

Hayem solüsyonu hazırlanışı:

Na₂SO₄: 5 g

NaCl: 1 g

HgCl₂: 0,5 g

Bidistile su: 200 ml

$$\text{Yoğunluk (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Sayılan hücre sayısı}}{\frac{\text{Sayılan büyük kare sayısı} \times \text{Büyük kare hacmi} \times \text{Sulandırma oranı}}$$

Ölü/Canlı Spermatozoa Oranı (%)

Boyama yöntemiyle (%2'lik Eosin) ölü/canlı spermatozoa oranları yüzde olarak belirlendi. Bu işlem vücut ısısına ayarlanmış lam, lamel ve %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.

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. Sperma, Hancock solüsyonu içerisinde fikse edildi ve hazırlanan bu solüsyondan bir damla lam üzerine konulup lamel kapatıldı ve kapatılan lamel üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılarak 100X büyütmede 400 spermatozoon sayılarak morfolojileri yüzde tespit edildi.

Hancock solüsyonu hazırlanışı

I. Solüsyon:	NaCl	1,13 g
	Bidistile ad.	62,50 ml
II. Solüsyon:	25 ml (a) + 10 ml (b) karıştırılır.	
	a) Na ₂ PO ₄ * 2H ₂ O	2,71 g
	Bidistile ad.	62,50 ml
	b) KH ₂ PO ₄	2,78 g
	Bidistile ad.	62,50 ml

Hancock solüsyonu:

I. Solüsyon	18,75 ml
II. Solüsyon	12,50 ml
Formalin	7,81 ml
Bidistile ad.	62,50 ml

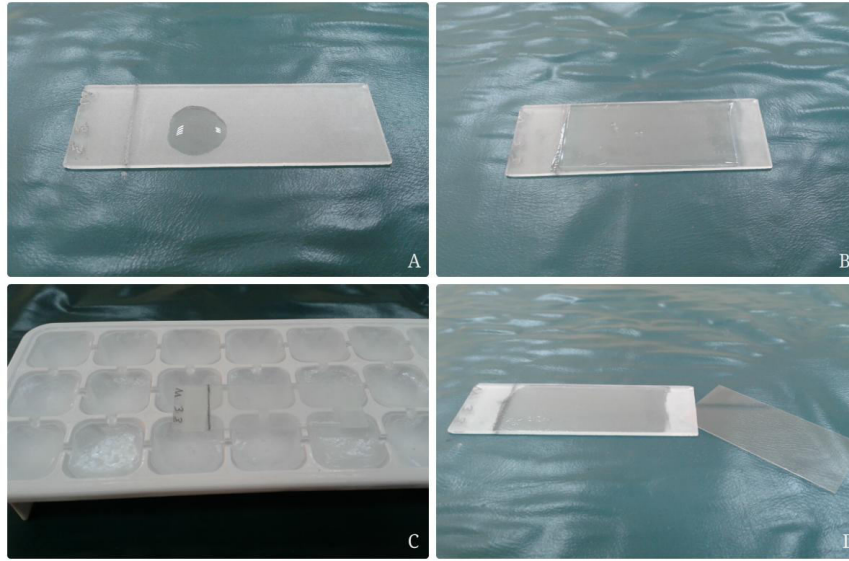
2.5.2. Taze Spermada Spermatozoon DNA Hasar Tespiti

Spermatozoon DNA hasarı, mikroskop kullanılarak hücrelerdeki DNA zincir kırılmasını görselleştirmek ve ölçmek için kullanılan bir jel elektroforez yöntemi olan Comet (Tek Hücreli Jel Elektroforezi) yöntemi kullanılarak saptandı (Olive, 2002).

Sperma yıkama: Sperma Mg⁺² ve Ca⁺² iyonları içermeyen fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile +4 °C'de iki kez santrifüj edilerek (800xg'de 10 dk.) yıkandı ve

yıkama işleminin sonunda PBS ile 20×10^6 sp/ml olacak şekilde tekrar sulandırıldı (Fraser ve Strzezek, 2004; Nandre, 2007.)

Slayt hazırlama ve jel yerleştirme: Hazırlanan agarları tutması için özel hazırlanmış tamamına kumlama işlemi yapılmış lamalar kullanıldı (Şekil 12). Lamalar üzerine iki katman halinde agarlar yayıldı. Alt katman için %0,75'lik normal erime noktasındaki agar (normal melting agarose, NMA) PBS ile hazırlandı ve bu agarozdan 100 µl dondurulmuş slaytın üzerine froti çekilerek bırakıldı, sonra jel oda ısısında en az 5 dakika bekletilerek kurutuldu. Üst katman için 80 µl %0,75'lik düşük erime noktasına (low melting agarose, LMA) sahip agar ile yıkandıktan sonra PBS ile dilüe edilen spermadan alınan 8 µl sperma süspansiyonu karıştırıldı, alt katmanın üstüne karışım ilave edildi ve 24 x 60 mm lamel ile kapatılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de katılaşması için bekletildi. Katılaşma tam sağlandıktan sonra lameller dikkatlice üst katman üzerinden çekilerek slaytlar hazırlandı (Hughes ve ark., 1997; Singh ve ark., 2003).



Şekil 12. Slayt hazırlama ve jel yerleştirme. A: Özel tamamı kumlanmış slayt, B: Slayt üzerine konulan agar jelin lamel kapatılarak yayılması, C: Agarın katılaştırılması, D: Lamelin üzerinden çekilerek katılaşan agarın son hali

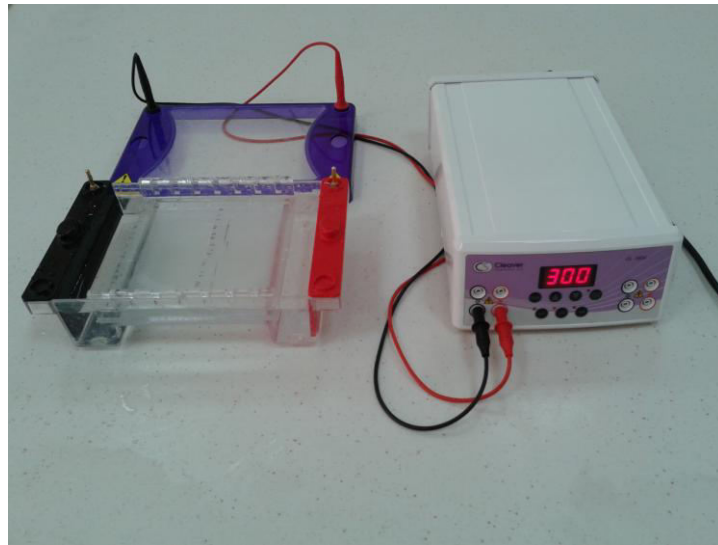
Hücre lizisi: $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki soğuk lizis solüsyonu (2,5 M NaCl, 100 mM Na_2 EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100, pH: 10) hazırlandı ve slaytlar içine daldırılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir saat bekletildi. Sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki DTT (Dithiothreitol) solüsyonundan (40mM) eklendi ve yine $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat bekletildi. En son olarak lizis solüsyonuna proteinase K (100 µg/ml) ilave edildi ve içinde slaytlar bulunan lizis solüsyonu 37°C 'de

yaklaşık 15 saat süreyle inkübasyona bırakıldı (Şekil 13) (Hughes ve ark., 1997; Singh ve ark., 2003).



Şekil 13. Coplin jar içerisinde slaytların lizisi

Slaytların elektroforez işlemi: Lizis işleminin ardından slaytlar DNA zincirlerinin ayrılması için taze olarak hazırlanmış ve soğutulmuş elektroforez tamponunda (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH 12,5) 20 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından slaytlar bu tampon çözelti içerisinde 300 mA ve 20 volt'luk elektriksel alanda 20 dk. yürütüldü (Şekil 14) (Hughes ve ark., 1997; Singh ve ark., 2003).

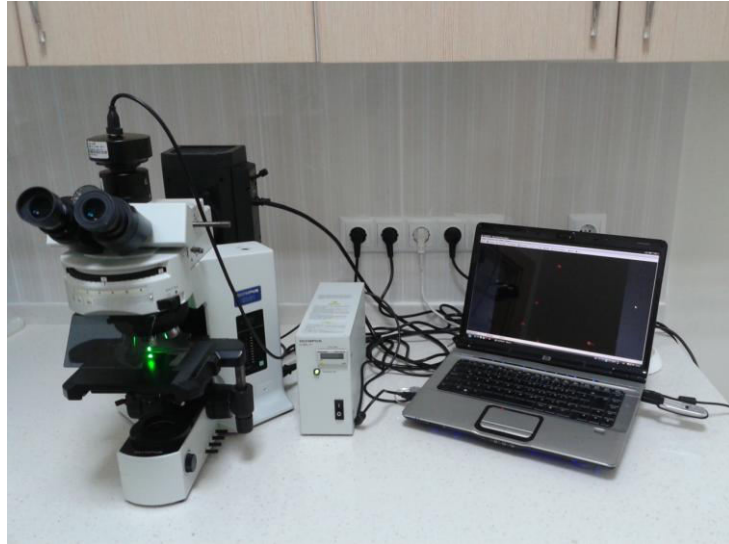


Şekil 14. Slaytların elektroforezde yürütülme işlemi

Slaytların nötralizasyon işlemi: Elektroforez işlemi sonrası elektroforez çözeltilisindeki alkalilik durumunu ve deterjanların uzaklaştırılması için slaytların taze hazırlanmış Tris tamponuyla (40 mM Tris HCl, pH 7.4) 3 kez yıkanarak nötralizasyon işlemi sağlandı (Hughes ve ark., 1997; Singh ve ark., 2003).

Slaytların boyanması işlemi: Nötralizasyon işlemi takiben slaytlar floresan bir boya olan ethidium bromide (5 µg/ml) kullanılarak boyandı ve DNA'lar 4 saat içerisinde değerlendirildi (Hu ve ark., 2008).

Comet şekil analizi: Kamera ataçmanlı floresan mikroskop (Olympus BX-51) ile bilgisayar sistemine sahip görüntü analiz sistemi (TriTek Cometscore™ version 1.5 software) kullanılarak hasarlı hücrelerin Comet parametreleri her sperma için 100 adet DNA görüntüsü değerlendirilerek belirlendi (Şekil 15) (Xu ve ark., 2013).



Şekil 15. Görüntü analiz sistemi ile Comet parametrelerinin değerlendirilmesi

2.6. Deneme Grubu (Dondurulmuş Sperma) Muayeneleri

2.6.1. Spermanın Sulandırılıp Dondurulması

Ticari bir sulandırıcı olan Bioxcell® sulandırıcısı ile içinde $120-150 \times 10^6$ sp/ml yoğunluğunda olacak şekilde (Sansone ve ark., 2000) sulandırılan epididimal sperma, manuel olarak 0,25 ml'lik payetlere çekildikten sonra önerilen prosedüre uygun olarak $+5^\circ\text{C}$ 'de 4 saat equilibrasyona tabi tutuldu. Equilibrasyon sonrası payetler sıvı azot buharında ortalama -80°C ila -120°C 'de yaklaşık 20 dakika boyunca tutularak donduruldu ve son olarak da -196°C 'deki sıvı azota daldırılıp çözündürme işlemine kadar saklandı.

2.6.2. Dondurulmuş Spermın Çözdürülmesi

En az 24 saat boyunca -196°C 'deki sıvı azotta saklı tutulan payetler 37°C 'deki su banyosunda 25-30 saniye bekletilerek çözdürüldü (Arriola ve Foote, 1987).

2.6.3. Dondurulmuş Spermada Spermatolojik Muayeneler

Çözdürülme işleminin hemen sonrasında vakit kaybetmeden spermatolojik muayenelerden spermatozoa progresif motilitesi (%), ölü/canlı spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (%) saptanması işlemleri yukarıda bahsedildiği gibi tekrarlandı.

2.6.4. Dondurulmuş Spermada DNA Hasar Tespiti

Spermatolojik muayenelerin ardından işlemleri çözdürülen spermalarda DNA hasarı için Comet testi yukarıda bahsedildiği gibi tekrarlandı.

2.7. İstatistiksel Analiz

Ortalama, standart sapma (SD) ve ortalamaların standart hatası (SEM) SPSS istatistik paket programı (Versiyon 21, IBM Corp., USA) kullanılarak hesaplandı. Veriler ortalama \pm SEM olarak verildi. Testis ve epididimisin morfometrik ölçüm bulguları ANOVA ile karşılaştırıldı ve fark saptananların belirlenmesinde Tukey's testi kullanıldı. Taze ve dondurulmuş spermadaki spermatolojik muayene bulgularının istatistik analizi Paired t-testi kullanılarak yapıldı. Taze ve dondurulmuş spermadaki Comet DNA analizi bulgularının karşılaştırılmasında ise t testi kullanıldı. Kendi içlerinde, testislerin morfometrik ölçüleri arasındaki, taze ve dondurulmuş spermının spermatolojik verileri arasındaki ve yine testislerin morfometrik ölçüleri ile taze spermının spermatolojik verileri arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon analizi kullanılarak belirlendi.

3. BULGULAR

50 adet erkek Anadolu mandasının kesim sonrası elde edilen materyalleri testisin boy, en ve çevre uzunlukları; testis-epididimisin toplam hacmi; testis, cauda epididimis, corpus epididimis ve caput epididimisin ağırlıkları; spermatolojik muayenelerden spermatozoa progresif motilitesi (%), spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^6$ sp/ml), ölü/canlı spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (%) ve spermatozoon DNA hasarı (%) yönünden değerlendirildi.

3.1. Testis ve Epididimisin Morfometrik Ölçüm Bulguları

Araştırmada kullanılan mandaların morfometrik testis ölçümlerinden testisin boy, en ve çevre uzunlukları, testis-epididimisin toplam hacmi ve testis, caput epididimis, corpus epididimis ve cauda epididimisin ağırlıklarına ait ortalama değerler ve bu değerlere ilişkin istatistiksel analizler Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Testis ve epididimisin morfometrik ölçüleri

Ölçümler n=50	Organlar	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Min.	Maks.
Hacim (ml)	Testis - Epididymis	128,60 \pm 4,56	90,00	230,00
	Testis	115,52 \pm 4,46	64,70	213,30
Ağırlık (g)	Caput Epididymis	7,58 \pm 0,26	4,33	14,40
	Corpus Epididymis	3,20 \pm 0,10	1,58	4,90
	Cauda Epididymis	4,60 \pm 0,22	1,94	9,83
	Boy uzunluğu (cm)	Testis	9,13 \pm 0,16	6,90
En uzunluğu (cm)	Testis	5,09 \pm 0,06	4,30	6,40
Çevre uzunluğu (cm)	Testis	22,41 \pm 0,32	18,05	29,04

3.2. Spermatolojik Muayene Bulguları

Araştırma süresince mandalardan elde edilen taze spermadaki spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^6$ sp/ml), spermatozoa progresif motilitesi (%), ölü spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranları olan baş-akrozom anomalisi (%), orta kısım anomalisi (%), kuyruk anomalisi (%) ve toplam anomaliye (%) ait ortalama değerler ve bu değerlere ilişkin istatistiksel analizler Tablo 9’da verilmiştir.

Dondurulan spermalarda çözündürülme işleminden sonra spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^6$ sp/ml) hariç, spermatolojik muayenelerden spermatozoa progresif motilitesi (%), ölü spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranları olan baş-akrozom anomalisi, orta kısım anomalisi, kuyruk anomalisi ve toplam anomali (%) muayenelerinin tekrarlanması sonucu elde edilen ortalama değerler ve bu değerlere ilişkin istatistiksel analizler Tablo 9’da verilmiştir.

Spermatolojik muayeneler sonucu yapılan istatistiki değerlendirmede taze sperma ile çözüm sonu sperma progresif motilitesi, ölü spermatozoa oranı, orta kısım anomalisi, kuyruk anomalisi ve toplam anomalisi değerleri arasındaki farkların ($p < 0,001$) önemli olduğu gözlenmiştir. Sadece baş-akrozom anomalisi değerleri arasındaki farkın önemsiz olduğu gözlenmiştir.

Tablo 9. Taze ve dondurulmuş spermadaki spermatolojik muayene bulguları

Spermatolojik parametreler		Taze sperma	Dondurulmuş sperma	P
		$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
Progresif motilite (%)		50,10 \pm 1,78	27,50 \pm 1,41	0,000
Ölü spermatozoa (%)		16,58 \pm 0,48	36,76 \pm 0,95	0,000
Anormal spermatozoa (%)	Baş-akrozom	3,38 \pm 0,26	3,50 \pm 0,23	0,607
	Orta kısım	15,00 \pm 0,84	22,10 \pm 1,11	0,000
	Kuyruk	13,68 \pm 1,10	17,30 \pm 1,07	0,000
	Toplam	32,06 \pm 1,62	42,90 \pm 1,64	0,000

3.3. Spermatozoon DNA Hasarı Bulguları

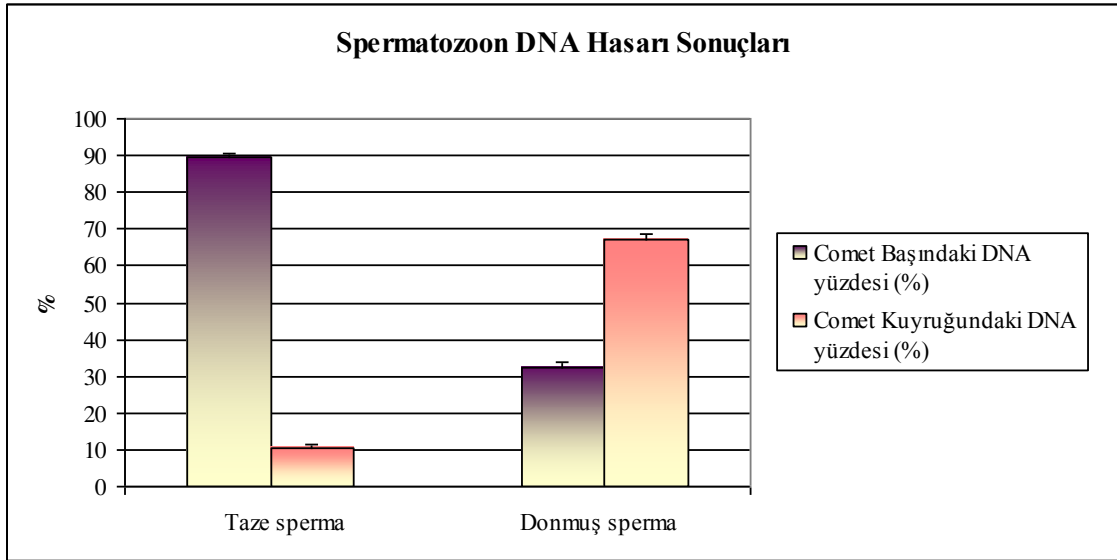
Spermatozoon DNA hasarı ölçümünde jel elektroforez yöntemi olan Comet (Tek Hücreli Jel Elektroforezi) yöntemi kullanılarak elde edilen taze spermadaki spermatozoon DNA hasarı Comet parametrelerinden, Comet başındaki DNA yüzdesi

(%) ve Comet kuyruğundaki DNA yüzdesine (%) ait ortalama değerler ve bu değerlere ait istatistiksel veriler Tablo 10 ve Şekil 16’da verilmiştir.

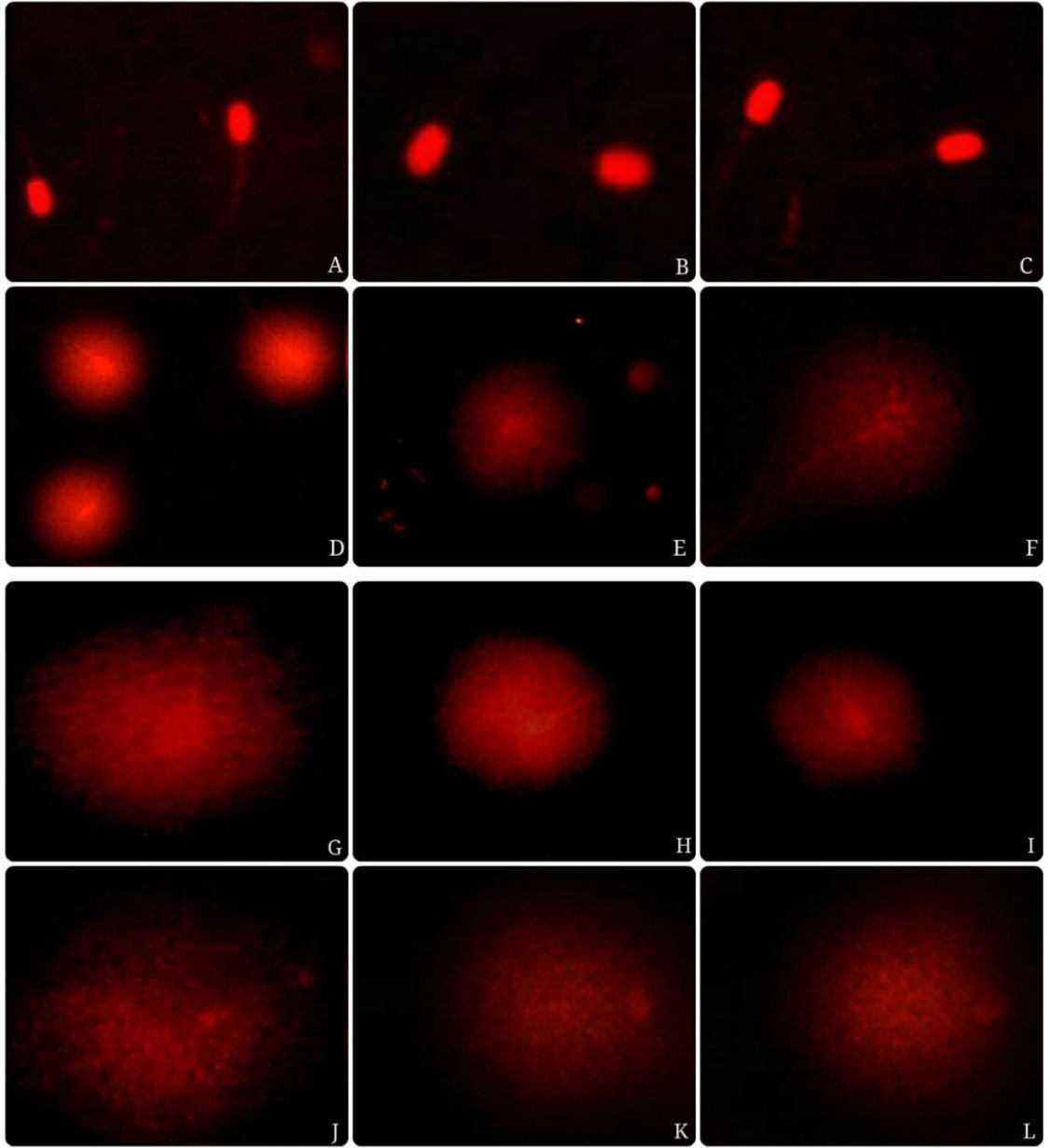
Elde edilen spermaların DNA hasarı muayenesi sonucu yapılan istatistiki değerlendirmede taze sperma ile çözüm sonu spermadaki Comet başındaki DNA yüzdesi ve Comet kuyruğundaki DNA yüzdesine ait değerleri arasındaki farkların ($p < 0,0001$) önemli olduğu gözlenmiştir. Muayeneler sonucunda görüntüleme sistemi ile elde edilen Comet şekilleri Şekil 17’de verilmiştir.

Tablo 10: Taze ve dondurulmuş spermadaki Comet DNA analizi bulguları

Comet Parametreleri	Taze sperma	Donmuş sperma	P
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
Comet Başındaki DNA yüzdesi (%)	89,44 \pm 1,0	32,47 \pm 1,3	0,0000
Comet Kuyruğundaki DNA yüzdesi (%)	10,58 \pm 1,0	67,29 \pm 1,3	0,0000



Şekil 16. Taze ve dondurulmuş spermada karşılaştırılmalı olarak DNA hasarı muayene sonuçları



Şekil 17. Elde edilen Comet şekilleri. A, B, C: Lize edilmemiş spermatozoonlar. D, E, F: Kontrol grubu spermatozoanın Comet görüntüleri. G, H, I: Az hasarlı DNA'ya sahip spermatozoonlar. J, K, L: Hasarlı DNA'ya sahip spermatozoonlar

Araştırma boyunca elde edilen testislerin morfometrik ölçümleri arasındaki korelasyon bulgularından testis hacmi ve cauda epididimis ağırlığı arasındaki ($p<0,001$), testis boy uzunluğu ile cauda epididimis ağırlığı arasındaki ($p<0,01$), testis en uzunluğu ile cauda epididimis ağırlığı arasındaki ($p<0,001$) ve testis çevre uzunluğu ile cauda epididimis ağırlığı arasındaki ($p<0,001$) değerler önemli bulunmuştur.

Taze spermanın spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulgularında orta kısım anomalisi ile baş akrozom anomalisine ait değer ($p<0,05$) önemli bulunmuştur.

Testislerin morfometrik ölçümleri ile taze spermanın spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulgularından progresif motilite ile cauda epididimis ağırlığı arasındaki değer ($p<0,05$) önemli bulunmuştur.

Araştırma boyunca elde edilen testislerin morfometrik ölçümleri arasındaki korelasyon bulguları Tablo 11’de, taze spermanın spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulguları Tablo 12’de, dondurulmuş spermanın spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulguları Tablo 13’te ve testislerin morfometrik ölçümleri ile taze spermanın spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulguları Tablo 14’te verilmiştir.

Morfometrik ölçümlerden testis çevre uzunluğu ile testis boy uzunluğu, testis en uzunluğu ve testis ağırlığı bulguları arasındaki korelasyonlar oldukça önemli bulunmuştur.

Taze spermanın spermatolojik özelliklerinden toplam spermatozoa anomalisi ile orta kısım anomalisi ve kuyruk anomalisi bulguları arasındaki, Comet kuyruğundaki DNA yüzdesi ile Comet başındaki DNA yüzdesi bulguları arasındaki korelasyonlar oldukça önemli bulunmuştur.

Tablo 11. Araştırma boyunca elde edilen testislerin morfolometrik ölçümleri arasındaki korelasyon bulguları

	Testis Ağırlığı	Caput Epididimis Ağırlığı	Corpus Epididimis Ağırlığı	Cauda Epididimis Ağırlığı	Testis Hacmi	Testis Boy Uzunluğu	Testis En Uzunluğu	Testis Çevre Uzunluğu
Testis Ağırlığı	—							
Caput Epididimis Ağırlığı	0,512***							
Corpus Epididimis Ağırlığı	-0,001	0,166						
Cauda Epididimis Ağırlığı	0,569***	0,239	-0,079					
Testis Hacmi	0,649***	0,421**	-0,055	0,476***				
Testis Boy Uzunluğu	0,679***	0,241	-0,182	0,392*	0,488***			
Testis En Uzunluğu	0,661***	0,499***	0,121	0,438**	0,594***	0,534***		
Testis Çevre Uzunluğu	0,756***	0,365*	-0,134	0,446**	0,573***	0,947***	0,724***	—

* p < 0,01, ** p < 0,001, *** p < 0,0001

Tablo 12. Taze spermanın spermatojik özellikleri arasındaki korelasyon bulguları

	Baş Akrozom Anomalisi	Orta Kısım Anomalisi	Kuyruk Anomalisi	Toplam Anomali	Progresif Motilite	Ölü Spermatozoa	Comet Başındaki DNA Yüzdesi	Comet Kuyruğundaki DNA Yüzdesi
Baş Akrozom Anomalisi	—							
Orta Kısım Anomalisi	0,313*							
Kuyruk Anomalisi	0,261	0,208						
Toplam Anomali	0,497**	0,706**	0,824**					
Progresif Motilite	-0,267	-0,042	0,074	-0,015				
Ölü Spermatozoa	0,199	0,144	0,183	0,229	-0,192			
Comet Başındaki DNA Yüzdesi	0,098	0,175	0,070	0,153	0,065	0,014		
Comet Kuyruğundaki DNA Yüzdesi	-0,097	-0,174	-0,070	-0,153	-0,068	-0,014	-1,000**	—

* p < 0,05, ** p < 0,0001

Tablo 13. Dondurulmuş spermanın spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulguları

	Baş Akrozom Anomalisi	Orta kısım Anomalisi	Kuyruk Anomalisi	Toplam Anomali	Progresif motilite	Ölü spermatozoa	Comet Başındaki DNA yüzdesi	Comet Kuyruğundaki DNA yüzdesi
Baş Akrozom Anomalisi	—							
Orta kısım Anomalisi	0,114							
Kuyruk Anomalisi	-0,078	0,098						
Toplam Anomali	0,170	0,759*	0,707*					
Progresif motilite	-0,126	0,094	-0,051	0,013				
Ölü spermatozoa	0,108	-0,012	-0,125	-0,074	-0,005			
Comet Başındaki DNA yüzdesi	-0,078	0,038	0,040	0,040	-0,040	-0,123		
Comet Kuyruğundaki DNA yüzdesi	0,097	-0,035	-0,037	-0,034	0,019	0,123	-0,990*	—

* p < 0,0001

Tablo 14. Testislerin morfometrik ölçümleri ile taze spermanın spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulguları

	Testis Ağırlığı	Caput Epididimis Ağırlığı	Corpus Epididimis Ağırlığı	Cauda Epididimis Ağırlığı	Testis Hacmi	Testis Boy Uzunluğu	Testis En Uzunluğu	Testis Çevre Uzunluğu
Baş-Akrozom Anomalisi	-0,095	0,060	0,029	-0,044	0,081	0,070	0,037	0,047
Orta kısım Anomalisi	0,056	0,212	-0,029	-0,019	0,206	0,226	0,088	0,222
Kuyruk Anomalisi	-0,169	-0,034	-0,013	0,069	0,013	-0,143	-0,094	-0,139
Toplam Anomali	-0,100	0,096	-0,019	0,030	0,128	0,031	-0,012	0,028
Progresif motilite	0,208	-0,018	-0,047	0,280*	0,211	0,023	0,049	0,031
Ölü spermatozoa Comet	-0,022	-0,008	-0,011	-0,271	-0,036	-0,116	-0,099	-0,110
Başındaki DNA yüzdesi Comet	-0,115	-0,041	-0,036	0,094	0,039	-0,164	-0,147	-0,135
Kuyruğundaki DNA yüzdesi	0,116	0,043	0,036	-0,095	-0,039	0,165	0,149	0,136

* p < 0,05

4. TARTIŞMA

Anadolu mandası; Türkiye’de var olan ve uzun yıllardır başta süt olmak üzere et, deri ve işgücünden yararlanmak amacıyla yetiştirilmesi yapılan ve nehir mandasından köken alan bir türdür (Nanda ve Nakao, 2003).

Mandalar sığırlara göre pubertaya daha geç ulaşmalarına rağmen, daha uzun bir reproduktif yaşama sahiptirler (Perera, 2011). Erkek mandalarda testislerdeki spermatojenik hücre bölünmeleri yaklaşık 12 aylıkken başlar ve aktif spermatogenezis 15 aylıkken görülebilir. Bununla birlikte, ejakülat 24-30. aylıktan sonra canlı spermatozoon içermektedir. Aktif spermatogenezis ve ejakülattaki yaşayabilir spermatozoon içeriğinin yaşlara göre değerlendirilmesinin yapıldığı araştırmalar erkek mandalarda pubertaya ulaşma için uygun dönemin 12-30 aylık dönem olduğunu göstermiştir (Perera, 1999). Bu bağlamda araştırmamızda materyalimiz, 3 yaş ve üzeri hayvanlar olarak istenilen ve tercih edilen kesim yaşı sınırları içerisindeki yaş grubundan tercih edilmiştir.

Mandalarda epididimal sperma ile ilgili yapılan çalışmalarda doku dejenerasyonun zararlı etkileri nedeniyle testislerin kesim sonrası laboratuvara ulaştırılma konusu büyük önem taşımakta ve spermatozoanın post-mortem elde edilmesi işleminin ivedilikle yapılması önerilmektedir (Hopkins ve ark., 1988). Yapılan bir araştırmada kesim sonrası vakit kaybetmeden karkastan alınan testisler buz dolu bir kaba konularak laboratuvara getirilmiştir. Bu çalışmada testisler alındıktan sonra minimum 40 dk., maksimum 4 saat içerisinde işleme alınmıştır (Lambrechts ve ark., 1999). Başka bir çalışmada ise kesim sonrası 30 dk. içerisinde skrotal insizyon ile testisler alınmıştır. Sonrasında vas deferens, cauda epididimis ve corpus epididimis bölümleri testisten ayrılarak 15-18°C sıcaklıkta laboratuvara getirilmiş ve sperma, 23-25 gauge’luk enjektör ile vas deferense sulandırıcı verilerek yapılan yıkama işlemi ile elde edilmiştir. Bu çalışmada materyalin işleme süresi 2-5 saat olarak kaydedilmiştir (Herold ve ark., 2004a). Yine başka bir çalışmada 23-25 gauge’luk enjektör ile vas deferense sulandırıcı verilerek yapılan yıkama ile sperma elde edilmiştir. Kesimden sonraki 30 dk. içerisinde bu yıkama işlemi bitirilmiştir (Herold ve ark., 2004b). Hiron ve ark. (2006), kesim sonrası alınan testislerin laboratuvara getirilmesi işleminde herhangi bir sıcaklık işlemi uygulanmayan %0,89’luk NaCl solüsyonunu tercih etmişlerdir. Araştırmamızda kesim sonrası vakit kaybetmeden karkastan alınan testisler

buz dolu kapalı bir kaba konularak laboratuvara getirilmiş ve testisler alındıktan sonra minimum 40 dk., maksimum 4 saat içerisinde işleme alınmıştır.

Üreme organlardaki değişim ve farklılıkların, üreme sistemi ve spermatoza üretimi üzerine etkisini inceleyen birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalarda spermatoza üretimi ve reproduktif yapının tüm bileşenlerinin, morfolojik parametreler ile etkileşimde olduğu gözlenmiştir (Hahn ve ark., 1969; Sharma ve Gupta, 1979; Neely ve ark., 1982; Aksu ve Tekin, 1994; Pant ve ark. 2003). Boğalarda, küçük testis boyutları sıklıkla testiküler dejenerasyon veya hipoplazi sonucu infertilite ile ilişkilendirilmiştir (Mcentee, 1970). Murrah ırkı mandalarda skrotal çevre uzunluğu ile sperma miktarı ve yoğunluğu arasında önemli derecede pozitif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Arrighi ve ark., 2010).

Testislerin boy, en ve çevre uzunluklarının incelendiği araştırmalarda çeşitli değerler tespit edilmiştir. Aksu ve Tekin (1994), boğalarda testiküler gelişmeyi inceledikleri araştırmalarında 30 aylık ve üzeri canlı hayvanlarda skrotal çevre uzunluğunu 38,6-41,1 cm olarak tespit etmişlerdir. Boğaların incelendiği diğer bir araştırmada testis boy, en ve çevre uzunlukları sırasıyla ortalama 10,1 cm, 5,6 cm ve 28,1 cm olarak bulunmuştur (Neely ve ark., 1982). Murrah ırkı mandalarda skrotal çevre uzunluğunun değerlendirildiği bir araştırmada 3 yaş ve üzeri canlı hayvanlarda skrotal çevre uzunluğu $24,5 \pm 2,8$ ile $32,1 \pm 1,5$ arasında kaydedilmiştir (Pant ve ark., 2003). İbrahim ve ark. (2013), 3-6 yaş arası mandalarda kesim sonrası değerlendirdikleri testis boy uzunluklarını 8,70 cm ile 9,69 cm arasında, en uzunluklarını 4,17 cm ile 4,62 cm arasında bulmuşlardır. Testislerin boy, en ve çevre uzunluklarına ait araştırmamızda elde edilen değerlerden boy ve en uzunlukları İbrahim ve ark. (2013) ve Neely ve ark. (1982)'nin elde ettiği değerler ile uyumlu değerler göstermiştir. Çevre uzunlukları Pant ve ark. (2003)'nin yaptıkları araştırmanın sonuç değerleri ile uyumluluk gösterirken, Aksu ve Tekin (1994) ve Neely ve ark. (1982)'nin yaptıkları araştırmanın sonuç değerlerine göre düşük değerler göstermiştir.

Lokal anestezi altına testisleri kastrasyon ile alınan mandalarda yapılan bir çalışmada testis hacmi 44,52 lt ile 64,07 lt arasında bulunmuştur (Sharma ve Gupta, 1979). Pant ve ark. (2003), canlı Murrah ırkı mandalarda yaptıkları araştırmalarında 3 yaş ve üzeri mandalarda testis hacmini 175,9 lt ile 604,8 lt olarak tespit etmişlerdir. Boğalarda yapılan bir araştırmada testis ağırlığı ortalama 192,3 g olarak bulunmuştur

(Neely ve ark., 1982). Mandalarda yapılan araştırmalarda Sharma ve Gupta (1979), testis ağırlıklarını 111 g ile 191 g arasında tespit ederken (Sharma ve Gupta, 1979), Ibrahim ve ark. (2013), 95,20 g ile 106,48 g arasında, Arrighi ve ark. (2010), 165,99 g ve 168,99 g olarak tespit etmişlerdir. Amann ve Almquist (1962), yaptıkları çalışmalarında caput epididimis, corpus epididimis ve cauda epididimisin ağırlıklarına ait sırasıyla ortalama 7,4 g, 1,7 g ve 11,1 g bulgular elde etmişlerdir. Araştırmamızda elde edilen testis-epididimisin toplam hacim bulguları, Sharma ve Gupta (1979)'nın elde ettiği değerlerinden büyük bulunurken, Pant ve ark. (2003)'nin tespit ettiği alt değer ile uyumlu üst değerinden ise küçük bulunmuştur. Testis ağırlığı bulguları Ibrahim ve ark. (2013) 'nin bulduğu değerler ile uyumluluk gösterirken, Sharma ve Gupta (1979) ile Arrighi ve ark. (2010)'nin bulduğu değerlerden düşük gözlenmiştir. Amann ve Almquist (1962)'in verilerine göre caput epididimis, corpus epididimis ve cauda epididimisin ağırlıklarına ait bulgulardan caput epididimis ağırlığı uyumluluk gösterirken, corpus epididimis ağırlığı düşük, cauda epididimis ağırlığı ise yüksek gözlenmiştir.

Araştırma boyunca elde edilen testislerin morfometrik ölçümleri arasındaki korelasyon bulgularından testis hacmi ve caput epididimis ağırlığı arasındaki ($p<0,001$), testis boy uzunluğu ile cauda epididimis ağırlığı arasındaki ($p<0,01$), testis en uzunluğu ile cauda epididimis ağırlığı arasındaki ($p<0,001$) ve testis çevre uzunluğu ile cauda epididimis ağırlığı arasındaki ($p<0,001$) değerler önemli bulunmuştur. Testislerin morfometrik ölçümleri ile taze spermanın spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulgularından progresif motilite ile cauda epididimis ağırlığı arasındaki değer ($p<0,05$) önemli bulunmuştur.

Sunulan araştırmada elde edilen morfometrik testis ölçümleri ile ilgili bulguların literatür bilgileriyle paralellik arz etmesi bu çalışmanın benzer çalışmalarla uyum içerisinde olduğunun göstergesidir. Bunun yanında elde edilen bulguların bazılarının literatür bulgularından farklılık arz etmesi ise kullanılan hayvan türü ve manda ırklarında vücut kondisyonları başta olmak üzere genetik yapı, yaş, bakım ve beslenme, coğrafi konum ve iklim özellikleri gibi faktörlerin etkisine bağlı olabilir.

Manda spermasının, Bos taurus spermasından fiziksel ve biyokimyasal özellikler açısından kayda değer farklılıkları olduğu bildirilmiştir. Beslenme, barınma,

mevsim ve yaş manda boğalarındaki bireysel sperma kalitesi üzerinde güçlü bir etkiye sahip olabilmektedir (Chinnaiya ve Ganguli, 1990).

Mandalarda spermanın suni vajen ile elde edildiği çalışmalarda; Waheed ve ark. (2012), taze spermanın sulandırılma işlemi sonrası elde edilen ortalama motilitesini %69,3±0,43 olarak bulmuştur. Plazma membran bütünlüğünün ortalama %84,82±0,25 olarak gözleendiği bu çalışmada, ortalama baş anomalileri oranı %8,28±0,19, ortalama orta kısım anomalileri oranı %1,65±0,05 ve ortalama kuyruk anomalileri oranı %11,73±0,23 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada spermaların dondurulması sonucu elde edilen ortalama çözüm sonu motilitesi %48,83±0,45 olarak bulunmuştur. Yine laboratuvar ortamında hazırlanan Tris-yumurta sarısı-sitrat sulandırıcısı ile sulandırıldığı bir başka çalışmada çözüm sonu %28 progresif motilite oranı gözlenmiştir (Kadirvel ve ark., 2009).

Karşılaştırılmalı olarak ticari bir sulandırıcı olan Bioxcell® ile laboratuvar ortamında hazırlanan Tris-sitrat-yumurta sarısı sulandırıcılarının değerlendirildiği bir çalışmada çözüm sonu motilite değerleri sırasıyla %47,20 ve %39,16 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada değerlendirilen diğer parametreler olan akrozomal bütünlük oranı, HOST oranı ve canlı spermatozoa oranı çözüm sonu değerleri Bioxcell® sulandırıcısı için sırasıyla %21,96, %45,96 ve %61,88 olarak bulunurken, Tris-sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı için sırasıyla %19,28, %42,92 ve %55,08 olarak bulunmuştur (Asr ve ark., 2011).

Chinnaiya ve Ganguli (1980), çalışmalarında, sitratlı veya sitrik asit bazlı sulandırıcılara göre Tris-bazlı sulandırıcılarla daha iyi çözüm sonu motilite elde edildiği sonucuna varmışlardır. Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı, yumurta sarısı-sitrat, yumurta sarısı-glukoz-bikarbonat, yumurta sarısı-yağsız süt ve ticari bir sulandırıcı olan Laiciphos-271 sulandırıcılarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, bu sulandırıcılar arasında yumurta sarısı-yağsız süt ve Laiciphos sulandırıcıları ile diğer sulandırıcılardan daha yüksek çözüm sonu motilite değerleri saptanmıştır (Nour, 1980). Abdel-Rahman ve ark. (1988), sperma sulandırma işlemi için Tris-tabanlı ticari bir sulandırıcı olan Triladyl'in, yağsız sütlü sulandırıcılardan daha olumlu sonuçlara sahip olduğunu saptamışlardır.

Mevsim, hayvanın yaşı, beslenme durumu gibi birçok çevresel ve fizyolojik faktörler dışında mandalarda epididimal sperma özellikleri üzerine epididimlerin laboratuvara getirilmesi, kullanılan sulandırıcının özellikleri ve tercih edilen dondurma

protokolleri etkili olabilmektedir. Elde edilen epididimal manda spermasının yapılan çalışmalarda genellikle dondurulması amaçlanmıştır. Bu çalışmalarda dondurulmadan önceki spermatolojik parametre değerleri de kaydedilmiştir. Daha düşük fertilizasyon sonuçları nedeniyle manda spermasının sığır spermasına göre dondurma ve çözme sırasında oluşabilecek hasarlara karşı daha hassas olduğu bildirilmektedir (Raizada ve ark., 1990; Andrabi ve ark., 2008). Spermatozoon düşük sıcaklıklara dayanma konusunda çok hassastır, bundan dolayı bu hücrelerin dondurulması hücrenin canlılığında ve normal fonksiyonlarında kayba neden olmaktadır. Şiddeti farklı derecelerdeki hücresel hasar, dondurmanın her aşamasındaki farklı mekanizmalar ile meydana gelebilmektedir (Medeiros ve ark., 2002). Memeli sperması vücut sıcaklığından suyun donma noktasına yakın bir sıcaklığa yapılan soğutulmaya karşı çok hassastır. Soğuk şoku olarak bilinen spermatozoon hasarında çözündürme sonrası geri dönüşümsüz bir motilite kaybı olarak gözlenmektedir (Parks, 1997).

Manda spermasında kabul edilebilir fertilizasyon oranları, 30×10^6 - 120×10^6 sp/ml arasında değişen dondurulmuş sperma örnekleri ile elde edilmiştir (Tahir ve ark., 1981; Andrabi ve ark., 2006). Mandalarda <20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60 ve >60 milyon/doz oranları arasındaki suni tohumlama dozlarında benzer fertilizasyon oranları saptanmıştır (Tahir ve ark., 1981). 30×10^6 sp/0,5ml'den 15×10^6 sp/0,5ml'lik dozlara inilen bir çalışmada, saha şartlarında gebelik oranı araştırılmış ve dondurulmuş spermadaki bu dozların fertilizasyon oranını etkilemediği bildirilmiştir (Andrabi ve ark., 2006). Bu verilere paralel olarak araştırmamızda dondurulan sperma payetleri (0,25 ml) içerisinde $30-120 \times 10^6$ sp/ml yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanmıştır.

Mandalarda spermanın epididimal elde edildiği çalışmalarda; Herold ve ark. (2006), Afrika mandalarında ticari sulandırıcılar olan AndroMed® ve Triladyl™ sulandırıcılarını karşılaştırdıkları araştırmalarında taze epididimal spermada sırasıyla $\%35 \pm 21$ ve $\%21 \pm 9$ oranında progresif motilite sonuçları elde etmişlerdir. Hiron ve ark. (2006), tris-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcısı ile sulandırdıkları manda epididimal spermasında $\%72,75 \pm 0,91$ oranında progresif motilite sonuçları saptamışlardır. Yine Herold ve ark. (2004b), tarafından yapılan ve ticari sulandırıcılar olan AndroMed®, Triladyl™ ve Red Ovine Freezing Buffer sulandırıcılarının karşılaştırıldığı bir çalışmada epididimal manda spermasında sırasıyla $\%31 \pm 21$, $\%19 \pm 11$ ve $\%24 \pm 15$ oranında progresif motilite sonuçları elde etmişlerdir. Araştırmamız süresince

mandalardan elde edilen taze spermadaki spermatozoa progresif motilitesi oranı, Herold ve ark. (2006) ve Herold ve ark. (2004b)'nin bulduğu değerlerden yüksek iken, Hiron ve ark. (2006)'nin bulduğu değerlerden düşük gözlenmiştir.

Mandalarda taze epididimal spermada ölü spermatozoa oranının ve anormal spermatozoa parametrelerinin değerlendirildiği çalışmalarda çeşitli veriler elde edilmiştir. Lambrechts ve ark. (1999), akrozom bütünlüğünü ve ölü spermatozoa oranını araştırdıkları çalışmalarında, 1995 ve 1996 yıllarında yaptıkları değerlendirmelerde bu yıllar için sırasıyla %89,3±2,3 ve %93,5±2,2 oranlarında akrozomal bütünlük tespit ederken, ölü spermatozoa oranı için sırasıyla %9,6±2 ve %15,6±1,1 verilerini elde etmişlerdir. Kumar ve ark. (2008), %80,33±0,33 oranında akrozomal bütünlük tespit ederken, elde ettikleri ölü spermatozoa oranı %17,67±0,33 olarak bulunmuştur. Bir başka çalışmada elde edilen akrozomal bütünlük ve canlı spermatozoa oranları sırasıyla %80,2±1,08 ve %83,6±0,95 olarak tespit edilmiştir (Singh ve ark., 2007). Araştırmamız süresince mandalardan elde edilen taze spermadaki ölü spermatozoa oranı ile anormal spermatozoa oranları olan baş-akrozom anomalisi, orta kısım anomalisi, kuyruk anomalisi ve toplam anomali ait ortalama değerlerden ölü spermatozoa oranı Kumar ve ark. (2008) ve Singh ve ark. (2007)'nin bulduğu değerler ile uyumluluk gösterirken, Lambrechts ve ark. (1999)'nin bulduğu değerden düşük bulunmuştur. Anormal spermatozoa oranları ise literatür verilerindeki değerlerden düşük bulunmuştur.

Çözüm sonu progresif motilite değerlerinin karşılaştırıldığı çalışmada, yumurta sarısı içermeyen bir sulandırıcı ile (AndroMed[®], Minitüb, Germany) yumurta sarısı içeren iki sulandırıcıdan (TriladyI[™], Minitüb, Almanya ve Red Ovine Freezing Buffer, IMV, Fransa) elde edilen motilite değerleri sırasıyla %13±13, %18±12 ve %28±16 bulunmuştur (Herold ve ark., 2004b). Hiron ve ark. (2006), tris-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcısı ile manda spermasında çözüm sonu %51,58 motilite oranı saptamışlardır. Afrika mandasının epididimal spermasını dondurmada, ticari TriladyI[™] ve AndroMed[®] sulandırıcılarının karşılaştırılması olarak değerlendirildiği bir çalışmada çözüm sonu sperma progresif motilite değerleri %17±11 ile %14±13 arasında değişkenlik göstermiştir (Herold ve ark., 2006). Araştırmamız süresince donmuş spermadaki spermatozoa motilitesi oranı Herold ve ark. (2004b)'nin bulduğu değerlerden yüksek ve kısmen uyumlu iken, Herold ve ark. (2006)'nin bulduğu değerlerden yüksek, Hiron ve ark. (2006)'nin bulduğu değerlerden düşük gözlenmiştir.

Dondurma sonrası akrozomal bütünlük ve ölü spermatozoa oranlarının belirlendiği bir çalışmada Kumar ve ark. (2008), tarafından çözüm sonu %64,58±0,99 oranında akrozomal bütünlük ve %35,83±0,41 ölü spermatozoa verileri elde edilmiştir. Hiron ve ark. (2006), çözüm sonu %66,83±1,05 akrozomal bütünlük ve %68,67±0,94 canlı spermatozoa oranları tespit etmişlerdir. Herold ve ark. (2006), ticari sulandırıcılar olan AndroMed® ve Triladyl™ sulandırıcılarını karşılaştırdıkları araştırmalarında çözüm sonu epididimal manda spermasında sırasıyla %54±6 ve %56±6 oranında akrozomal bütünlük tespit etmişlerdir. Araştırmamız süresince donmuş spermadaki ölü spermatozoa oranı ile anormal spermatozoa oranları olan baş-akrozom anomalisi, orta kısım anomalisi, kuyruk anomalisi ve toplam anomaliye ait ortalama değerlerden ölü spermatozoa oranı Kumar ve ark. (2008) ve Hiron ve ark. (2006)'nın bulduğu değerler ile uyumluluk gösterirken, Herold ve ark. (2006)'nın bulduğu değerden düşük bulunmuştur. Anormal spermatozoa oranları ise literatür verilerindeki değerlerden düşük bulunmuştur.

Taze spermanın spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulgularında orta kısım anomalisi ile baş akrozom anomalisine ait değer ($p<0,05$) önemli bulunmuştur.

Sunulan araştırmada elde edilen spermatolojik değerler ile ilgili bulguların literatür bulgularından farklılık arz etmesinin sebepleri arasında ırk, yaş, bakım yöntemi, beslenme koşulları, araştırmanın yapıldığı bölgenin coğrafi konumu, iklim koşulları sayılabilir.

Araştırmamızda taze ve donmuş spermadaki progresif motilite, ölü spermatozoa oranı, orta kısım anomalisi, kuyruk anomalisi ve toplam anomali arasındaki farkların önemli ($p<0,001$) olduğu gözlemlendi. Sadece baş-akrozom anomalisi oranı arasında fark önemsiz bulundu.

Erkek genomundaki anomaliler, fertilizasyon sonrası oluşacak başarısızlık için açık bir potansiyel nedenidir (Sakkas ve ark., 2002; Sergerie ve ark., 2005). Saleh ve ark. (2002)'nin yaptıkları çalışma sonucu spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasarın fertilité üzerine olumsuz etkisi olduğu sonucuna varmışlardır.

Birçok somatik hücre kendi DNA'sındaki hasarlarla başa çıkabilecek çeşitli tamir mekanizmalarına sahipken bu durumun tersine spermatidler ve spermatozoa bu kadar etkili tamir mekanizmalarına sahip değildir (Sega, 1974; Sega ve ark., 1978).

Yapılan çalışmalar sonucu, spermatozoon DNA'sındaki oksidatif hasarın kalıtsal mutasyon ve kromozom anomalilerini artırarak, genetik materyal aktarımında hatalara, kısırlık, doğum defektleri, genetik hastalıklar ve doğan yavrularda kanser vakalarına neden olabileceği düşünülmektedir (Ames ve ark., 1994; Cummins ve ark., 1994).

Dondurma ve çözündürme işlemleri, stabil olmayan DNA artışları da dahil olmak üzere spermatozoon kromatininde önemli değişiklikler meydana getirebilir (Royere ve ark., 1988; Hamamah ve ark., 1990; Evenson ve ark., 1994; Peris ve ark., 2004). Spermatozoanın yüksek düzeyde reaktif oksijen moleküllerine maruz kalması sonucu DNA'sında hasar ve lipid peroksidasyon oluşmaktadır (Atiken, 1995; Potts ve ark., 2000). Sitoplazmada azalan antioksidan üretimi spermatozoayı serbest radikallerce oluşturulacak hasara karşı hassas hale getirmektedir (Said ve ark., 2005). Plazma membranındaki çoklu doymamış yağ asitleri içeriğinin yüksek oluşu ve spermatozoon sitoplazmasında antioksidan miktarının düşük düzeyde oluşu, bu yapıları dondurma işlemi sırasında oksidatif stres ve peroksidatif saldırıya karşı duyarlı hale getirir (Aitken ve ark., 1998; Chatterjee ve Gagnon, 2001).

Günümüzde yaygın olarak DNA parçalanmasının değerlendirilmesinde kullanılan Comet testinde lizis ve elektroforezisin pH koşullarına bağlı olarak bu tekniğin hassasiyeti değişebilmektedir. Her iki değişken için nötral koşulların kullanılması, DNA çift zincir kırılmalarının tespitine olanak tanır. pH: 12,3 olduğunda tek zincir kırılmaları ve DNA onarım bölgelerindeki gecikmeler tespit edilirken, pH: 13'te bunlara ek olarak alkali labil bölgelerde değerlendirilebilmektedir (Rojas ve ark. 1999).

Araştırmamızda spermatozoada DNA hasarını belirlemek için alkali Comet testi kullanılmıştır. Comet testi ile spermatozoon DNA hasarı düzeyi saptanmıştır. Yapılan araştırmalarda Comet testinden ayrı olarak, Tunel, SCSA ve akrinin oranj analizleri de kullanılmıştır (Henkel ve ark., 2004; Koonjaenak ve ark., 2007; Kadirvel ve ark., 2009; El-kon ve Darwish, 2011). Yapılan birçok araştırmada mandalarda spermanın dondurulması işleminin DNA hasarını önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir (Fraser ve Strzezek, 2005; El-kon ve Darwish, 2011). Bunun aksine bazı araştırmalarda da dondurma işleminin spermatozoon DNA hasarı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı da savunulmaktadır (Koonjaenak ve ark., 2007; Kadirvel ve ark., 2009). Mandalarda

yapılan bir çalışmada, taze spermadaki DNA hasarı donmuş spermadaki DNA hasarına göre $1,50 \pm 0,40$ 'dan $6,80 \pm 0,56$ 'ya yükselmiştir. Yine mandalarda yapılan bir çalışmada Kumar ve ark. (2011), taze spermadaki DNA hasarını %10 ile 12 arasında bulmuşken, bu değer donmuş spermada ortalama %37,25'e yükselmiştir. Araştırmamızda taze ve donmuş spermadaki DNA hasarı bulguları arasındaki farkların önemli ($p < 0,0001$) olduğu gözlemlendi. Ayrıca taze spermadaki DNA hasarı bulgularımız Kumar ve ark. (2011)'nin bulduğu değerler ile uyumluluk gösterirken, donmuş spermadaki DNA hasarı bulgularımız El-kon ve Darwish (2011) ve Kumar ve ark. (2011)'nin bulduğu değerlere göre yüksek bulunmuştur. Testislerin morfometrik ölçümleri ile taze spermadaki Comet parametreleri arasında önemli bir korelasyon bulgusuna rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra taze spermanın spermatolojik özellikleri ile Comet parametreleri arasında da önemli bir korelasyon bulgusuna rastlanmamıştır.

Sunulan çalışmada diğer araştırmalara göre daha yüksek oranda DNA hasarının saptanmasının nedeni, metod olarak alkali Comet testinin tercih edilmesinden kaynaklı olabileceğinden, bunun da bu metodun bazı hasarları, tek zincir kırıkları ve çapraz bağlarını tespit ederek daha fazla oranda hasarın tespit edilmesine olanak tanımasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca diğer araştırmalara göre araştırmamızda dondurulmuş spermadaki DNA hasarı miktarının fazla olmasının nedenlerinden biri de, araştırmamızda epididimal spermanın kullanılması olabilir. Bu da kullanılan sulandırıcıların epididimal sperma için tasarlanmamış olması ve epididimal spermanın seminal plazmadaki antioksidanlardan yoksun olmasından kaynaklanabilir.

Soğutma-dondurma-çözdürme işlemleri, spermatozoon membranı üzerinde fertilizasyon yeteneğinin azalmasına sebep olan fiziksel ve kimyasal stres meydana getirmesinin yanı sıra (Gadea ve ark., 2003), spermatozoon canlılığı üzerinde de %50'den fazla oranda azalmaya neden olabileceği kabul edilmektedir (Watson, 1979). Soğuk şoku, soğutma oranının kontrol edilmesiyle ve sperma sulandırıcılarına koruyucu bileşiklerin eklenmesi ile önlenabilir (Foote, 1984; Parks, 1997). Deneysel olarak sığır spermasında vücut sıcaklığından $+5^{\circ}\text{C}$ 'ye, $\leq 10^{\circ}\text{C}/\text{saat}$ oranında bir soğutma uygulanarak ve yumurta sarısı veya süt gibi koruyucu maddelerin kullanımı ile soğuk şoku şiddetinin azaltıldığı tespit edilmiştir (Parks, 1997).

Yapılan bir çalışmada çözüm sonu progresif motilite değerleri standart protokol kullanılarak dondurma işlemi yapılan spermada %25 iken, $20^{\circ}\text{C}/\text{dk.}$ ve

30°C/dk.'da soğutma işlemi uygulanarak dondurulan spermada ise bu değer %40 olarak bulunmuştur (Sukhato ve ark., 2001). Çözüm sonu motilite için sulandırıcılarda 7,0 pH değerinin daha iyi sonuç verdiğini ortaya koymuşlardır (Abdel-Malak ve ark., 1993). Manda spermasının dondurulması için kriyoprotektif ajan olarak kullanılan gliserolün nihai konsantrasyonu %6,5-7,0'dir (Kumaresan ve ark., 2005; Shukla ve Misra, 2007). Manda spermasında bakteri kontrolü için GTLS kombinasyonunun, streptomisin ve penisilin kombinasyonundan daha etkili olduğu kanısına varılmıştır. Üstelik, GTLS kombinasyonu manda spermatozoa canlılığı için zararlı değildir (Hasan ve ark., 2001; Akhter ve ark., 2008). Manda spermasının 4 saatlik equilibrasyon süresinin 2 ve 6 saatlik equilibrasyon süresinden daha iyi sonuç verdiğini saptamışlardır (Salamon ve Maxwell, 2000). Başka bir çalışmada ise 4-9 saat arasında değişen sürelerde denenen equilibrasyon süresinin çözüm sonu sperma kalitesi üzerine bir etkisi olmadığı, daha kısa süredeki equilibrasyon sürelerinin ise zararlı olduğu sonucuna varılmıştır (Herold ve ark., 2004b). Manda sperması için kriyojenik prosedürler; 0,2-0,4°C/dk.'lık bir oranda 37°C ya da 39°C'den +4°C'ye soğutma, en az 2 saat sürede equilibrasyon ve sıvı azotun yaklaşık 4 cm üzerinde sıvı azot buharında 10-20 dk. sürede dondurma işlemleri olarak sıralanabilir (Medranol ve ark., 2002).Yapılan birçok suni tohumlama organizasyonları sonucunda sığır boğa sperması için pratikte çözdürme işleminde 37°C'de en az 30 saniye bekletme tavsiye edilmektedir (Marshall, 1984).

Son yıllarda geniş değişken bileşimi ve mikrobiyal kontaminasyonlardan dolayı egzotik hastalıklar riski nedeniyle seminal sulandırıcı gibi hayvansal kaynaklı bileşiklerin (örn: yumurta sarısı ve süt) kullanımı sık sık tartışmalara neden olmuştur (Bousseau ve ark., 1998; Thibier ve Guerin, 2000). Bu nedenle, yumurta sarısı yerine hayvansal kökenli olmayan, iyi tanımlanmış ve patojen içermeyen sulandırıcılar tercih edilmektedir. Ticari bir sulandırıcı olan Bioxcell® (IMV Technologies, L'Aigle, France) bu koşulları karşılamaktadır (Gil ve ark., 2003). Tris-sitrik asit-yumurta sarısı sulandırıcısı ile Bioxcell® sulandırıcısının karşılaştırıldığı bir çalışmada elde edilen gebelik oranları sırasıyla %44 ve %47 olarak saptanmıştır (Akhter ve ark., 2010). Dondurma protokollerinin incelendiği bir çalışmada da yapılan tohumlamalarda, standart protokol ve 20°C/dk. ve 30°C/dk.'da soğutma işlemi uygulanarak dondurulan spermaların gebelik oranları sırasıyla %28, %43 ve %40 olarak saptanmıştır (Sukhato ve ark., 2001).

Spermatozoon DNA bütünlüğü embriyonun, fötüsün ve yavrunun normal gelişimi de dahil olmak üzere doğal ya da yardımcı fertilizasyon tekniklerinin başarısı için önem arz etmektedir (Nandre, 2007). Manda sperması boğa spermasına göre, çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengin olduğu (Nair ve ark., 2006), donma ve çözünme hasarının nispeten daha fazla olduğu, çözüm sonu düşük motilite ve gebelik oranlarına sahip olduğu için oksidatif hasara daha eğilimli görünmektedir (Dhami ve Kodagali, 1990). Bu tehlikeler soğutma ve dondurma oranlarının optimizasyonu ve dondurulan spermatozoa için uygun sulandırıcı kullanılması ile en aza indirilebilir (Kumar ve ark., 1992). Hücrenin genetik materyalinde hasara sebep olan birçok faktör bulunmaktadır. Bu hasarların onarılması için gerekli mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle birlikte spermatozoon DNA'sındaki hasarın, fertilizasyondan sonra oosit içinde tamir mekanizması tarafından düzeltildiği bazı araştırmacılar tarafından iddia edilmektedir (Kopeika ve ark., 2003; Pina ve ark., 2005). Spermatozoon genomunda hasara yol açabilen etkenlerin bir kısmı yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Yardımcı üreme tekniklerinin işlem sürecinde yapılan hataların en az seviyelere indirilmesi ve yeni stratejilerin belirlenmesi yanında, in vivo ve in vitro tedbirlerin alınması ile spermatozoon DNA'sında oluşabilecek muhtemel hasarların en az seviyede stabil hale getirilmesi sağlanabilir (Türk ve ark., 2006).

Mandalarda verimliliği arttırmak amacıyla birçok biyoteknolojik yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan suni tohumlama uygulamasında kullanılan dondurulmuş sperma kalitesi, gebelik oranını etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Saacke, 1984). Çiftlik hayvanlarının üreme potansiyelini artırmak için bir dizi biyoteknolojik yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları; suni tohumlama, çoklu ovulasyon ve embriyo transferi, nükleer transfer veya embriyo klonlama, cinsiyet tayini, gamet ve embriyo dondurulması, oosit toplama (OPU), in vitro oosit maturasyonu (IVM) ve in vitro fertilizasyon (IVF) şeklinde sıralanabilir (Brackett ve ark., 1981; Pederson ve ark., 1991; Wilmut ve ark., 1992; Robinson ve McEvoy, 1993).

Spermanın dondurulması, dondurulan spermanın uzun zaman periyodunda saklanabilir oluşu ve uzak hayvan popülasyonları arasındaki genetik materyal değişimini kolaylaştırmak için dünya çapında ulaştırılabilir bir halde oluşu açısından çiftlik hayvanlarının ve tehlike altındaki türlerin korunması için suni tohumlamada önemli bir rol oynamaktadır (Vishwanath, 2003). Bazı türlerde, taze sperma ile elde

edilen fertilit e oranları dondurulmuş spermada yeteri kadar yüksek dozda motil spermatozoon kullanılması ile de elde edilebilir (Holth, 2000b). Mandalarda suni tohumlama, östrus tespiti ve bu işlem için uygun zamanı bulma g l ğindeki zorluklar nedeniyle dünya çapında kullanımı sınırlı kalmıştır (Baruselli ve ark., 2007).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada spermanın dondurma-çözdürme işleminin diğer hayvan ırklarında olduğu gibi epididimal manda spermasında da önemli ölçüde kayıplara yol açtığı sonucuna varılmıştır. Elde edilen epididimal spermalarda taze ve çözüm sonrası progresif motilite oranları yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuş ve post-mortem elde edilen epididimal manda spermasının biyoteknolojik yöntemlerde kullanılabilceği düşünölmektedir. Bununla beraber, damızlık değeri yüksek erkek mandanın herhangi bir nedenle ölümü durumunda epididimal sperma elde edilerek genetik materyal olarak yardımcı üreme tekniklerinde kullanılabilir. Bu çalışmanın mandalarda dölverimini olumsuz etkileyecek spermatozoon DNA hasarının düzeyi belirlenerek ölkemizde manda popölasyonunun iyileştirilmesine ilişkin yapılacak araştırmalara katkı sağlayacağı düşünölmektedir. Artan spermatozoon DNA hasarından döl veriminin ne derece etkilendiğinin belirlenmesi ve üreme özellikleri üzerine olumsuz etkisi olan ve genetik hastalık riski oluşturan spermatozoon DNA'sındaki hasarın belirlenerek bunun risklerinin ortadan kaldırılması için daha kapsamlı araştırmalar yapılmasının yararlı olacağı düşünölmektedir.

Sonuç olarak bu araştırmanın, bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutarak mevcut metotların iyileştirilmesi ile Anadolu mandasının verimliliğinin artırılmasına olanak sağlayacağı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas A, Andrabi SMH. Effect of different glycerol concentrations on motility before and after freezing, recovery rate, longevity and plasma membrane integrity of Nili-Ravi buffalo bull spermatozoa. *Pak Vet J.* 2002; 22: 1-4.
- Abdalla EB. Improving the reproductive performance of Egyptian buffalo cows by changing the management system. *Animal Reproduction Science.* 2003; 75: 1-8.
- Abdel-Malak MG, Abdel Malak G, Abdel Rahman A, Farahat AA, Abdou MSS. Viability of frozen buffalo semen in tris- yolk-fructose extender. *Proc 5th Annual Congr, Egypt Soc Anim Reprod Fert.* 1993; 171.
- Abdel-Rahman A.A. Studies on some biological changes of buffalo semen during freezing. *Cairo Univ, Ph D Thesis,* 1988; 47-48.
- Abdulkerim B, Birşen B, Mehmet U, Duygu E, Muhlise A. Kriyoprezervasyonun genotoksik etkilerinin comet yöntemi ile araştırılması. *Turk J Biochem.* 2004; 29(1): 1-176.
- Abdou MSS, El-Guindi MM, Mostafa MA, El-Wishy AB, Farahat A. Comparative study of the phosphatase activity in the semen of bovines (*Bos Bubalis* and *Bos Taurus*) in Egypt. *Zbl Vet Med A.* 1974; 21: 759.
- Abdou MSS, El-Guindi MM, El-Menoufy AA, Zaki K. Some biochemical and metabolic aspects of the semen of bovine (*Bubalus Bubalis* and *Bos Taurus*). III. Inorganic phosphorus relationships. *Z Tierzuchtg Zuchtgsbiol.* 1977; 94: 186.
- Abdou MSS, El-Guindi MM, El-Menoufy AA, Zaki K. Enzymic profile of the semen of bovines (*Bubalus Bubalis* and *Bos Taurus*). II. Parallelism between acid and alkaline phosphatase and various measures of semen quality. *Zbl Vet Med A.* 1978; 25: 814.
- Acott TS, Carr DW. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biology of Reproduction.* 1984; 30: 926–935.
- Adam RC. Manda sütü. Yardımcı Ders Kitabı. İzmir, Ege Ü Ziraat Fak Yayınları. 1975.
- Adiga SK, Khan Z, Upadhy D, Kalthur G, Kumar P. Ability of deoxyribonucleic acid–damaged sperm to withstand freeze-thaw–induced damage during cryopreservation. *Fertility and Sterility.* 2009; 92: 3.
- Agarwal A, Said MT. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2003; 9(4): 331-345.

- Aguiar PHP, Andrade VJ, Abreu JJ, Gomez NBN. Physical and morphological semen characteristics of buffaloes aged from four to eight years old. Proc 4th Int Buffalo Congr, Sao Paulo Brazil. 1994; 3: 486–488.
- Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. J Exp Zool. 1999; 284: 696–704.
- Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reprod Fertil Dev. 1995; 7: 659-668.
- Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl. 1988; 9: 367–376.
- Aitken, RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod. 1998; 59: 1037–1046.
- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the y chromosome. Reproduction. 2001; 122: 497–506.
- Akhter S, Ansari MS, Andrabi SMH, Ullah N, Qayyum M. Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus Bubalis*) bull semen. Reprod Domest Anim. 2008; 43: 272–278.
- Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Iqbal S, Ullah N. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus Bubalis*) semen in Bioxcell® extender. Theriogenology. 2010; 74: 951-955.
- Aksoy M, Tekin N. Mandalarda çeşitli yöntemlerle östrusun belirlenmesi. Doğa-TR. J. Of Veterinary and Animal Sciences. 1991; 17: 119-125.
- Aksu A, Tekin N. Değişik Irktan Damızlık Boğalarda Androlojik Muayeneler. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 1994; 41 (3-4): 409 - 422.
- Ali HH, Ahmed IA, Yassen AM. Sexual development and postpubertal changes in seminal characteristics of buffalo bulls. Alexandria J Agric Res. 1981; 29: 47.
- Alvarez JG, Touchston JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. J Androl. 1987; 8: 338–345.
- Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? J Androl. 1989; 10: 89–98.
- Amann RP, Almquist JO. Reproductive capacity of dairy bulls. VI. effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal physiology. J Reprod Fertil. 1962; 3: 260-268.

- Ames BN, Motchnik PA, Fraga CG, Shigenaga MK, Hagen TM. Antioxidants prevention of birth defects and cancer. In: Mattison GR, Olshan A, editors. Male-Mediated Development Toxicology. New York, Plenum Publishing Co. 1994; 243-259.
- Anderson D, Bishop JB, Garner RC, Ostrosky-Wegman P, Selby PB. Cyclophosphamide. Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutat Res.* 1995; 330: 115-181.
- Andrabi SMH. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus Bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod Dom Anim.* 2009; 44: 552-569.
- Andrabi SMH, Siddique M, Ullah N, Khan LA. Effect of reducing sperm numbers per insemination dose on fertility of cryopreserved buffalo bull semen. *Pak Vet J.* 2006; 26: 17-19.
- Andrabi SMH, Ansari MS, Ullah N, Anwar M, Mehmood A, Akhter S. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 2008; 104: 427-433.
- Anzar ML, He MM, Buhr TG, Kroetsch TG, Pauls KP. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod.* 2002; 66: 354-360.
- Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res.* 1997; 236(1): 231-237.
- Arrighi S, Bosi G, Groppetti D, Cremonesi F. Morpho-and histometric evaluations on the testis and epididymis in buffalo bulls during the different reproductive seasons. *The Open Anatomy Journal.* 2010; 2: 29-33.
- Arriola J, Foote RH. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J Dairy Sci.* 1987; 70: 1664-1670.
- Asr ST, Beheshti R, Kohram H. The evaluations of tris-citrate acid or bioxcell extenders on the post-thawed buffalo sperm parameters. *Annals of biological Research.* 2011; 2(4): 360-365.
- Awasthi MK, Kavani FS, Siddiquee GM, Sarvaiya NP, Derashri HJ. Is slow follicular growth the cause of silent estrus in water buffaloes? *Anim Reprod Sci.* 2007; 99: 258-268.
- Atasever S, Erdem H. Manda yetiştiriciliği ve Türkiye'deki Geleceği. *Omü Zir Fak Dergisi.* 2008; 23(1): 59-64.

- Bandyopadhyay SK, Roy DJ. Freezing and fertilising ability of spermatozoa. *Indian J Anim Health*. 1975; 14: 37–41.
- Barati F, Khaksary MM, Mohammadi GH. Cryopreservation of in situ cool stored buffalo (*Bubalus Bubalis*) epididymal sperm. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2009; 10(4): 29.
- Barile VL. Improving reproductive efficiency in female buffaloes. *Livest Prod Sci*. 2005; 92: 183–194.
- Bartels P, Lambrechts H, Kidson A, Friedmann Y. The potential of breeding disease-free african buffalo using assisted reproductive technology. In: Penzhorn BL, editor. *Proceedings of a Symposium on the African Buffalo as a Game Ranch Animal*. Onderstepoort, South Africa, Wildlife group of the South African Veterinary Association. 1996; 75–78.
- Baruselli PS, Barnabe VH, Barnabe RC, Visintin JA, Molero-Filho JR, Porto R. Effect of body condition score at calving on postpartum reproductive performance in buffalo. *Buffalo J*. 2001; 17: 53–65.
- Baruselli PS. Control of follicular development applied to reproduction biotechnologies in buffalo. *Proceedings of the I Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo*, Oct.3-5, 2001, Eboli, Italy.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Gimenes LU, Crepaldi GA. Fixed-time artificial insemination in buffalo. *Ital. J. Anim. Sci*. 2007; 6(2): 107-118.
- Başar M, Çakan M, Emir L, Aydos K. Spermden doğuma. www.androloji.Org.Tr/..../DNA%20hasarlarının%20erkek%20infertilitesinde%20önemi.doc 2009.
- Bates RG, Amine buffers for ph control. *Ann N Y Acad Sci*. 1961; 92: 341–356.
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2003; 24: 4.
- Bhosrekar MR, Nagarcenkar R. Investigations on semen quality and reproductive behaviour of buffalo bulls. *Annual Report*. Karnal, India, National Dairy Research Institute. 1971; 50–51.
- Bhosrekar MR, Mokashi SP, Purohit JR, Gokhale SB, Mangurkar BR. Effect of glycerolization and deep freezing on the levels and release of enzymes in buffalo semen in relation to initial seminal attributes. In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA, editors. *Proceedings of 4th World Buffalo Cong Sao Paulo Brazil*. Roma, Italy, International Buffalo Federation. 1994: 465–467.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*. 2000; 55: 282–288.

- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 2001; 56: 275–86.
- Blackshaw AW, Salisbury GW. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention. *J Dairy Sci*. 1957; 40: 1099–1106.
- Blesbois E. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poult Sci J*. 2007; 63: 213–222.
- Boe-Hansen, GB, Ersbøll, AK, Greve T, Christensen P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*. 2005; 63(7): 2006-2019.
- Borghese A. In: Technical Series 67, editor. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization. 2005.
- Borghese A, Mazzi M. Buffalo population and strategies in the world. In, Borghese A, editor. *Buffalo Production and Research*. 1st Ed., Rome, Italy. 2005; 1-39.
- Brackett BG, Seidel GE, Seidel S. *New technologies in animal breeding*. New York, Academic Press. 1981.
- Brown GC, Borutaite V. Nitric Oxide, Mitochondria and cell death. *Iubmb Life*. 2001; 52: 189-195
- Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2004; 35 (4): 159-169.
- Cabrera E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herraez MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus Aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*. 2005; 50: 144- 153.
- Cadet J, Berger M. Radiation-induced decomposition of the purine bases within DNA and related model compounds. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1985; 47(2): 127-43.
- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget J, Ravanat J, Sauvaigo S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*. 1999; 424 (1–2): 9–21.
- Calvin HI, Bedford JM. Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil. (Suppl)* 1971; 13: 65-75.
- Campanile G, Neglia G, Di Palo R, Gasparini B, Pacelli C, D'occhio MJ, Zicarelli L. Relationship of body condition score and blood urea and ammonia to pregnancy in Italian mediterranean buffaloes. *Reprod Nutr Dev*. 2006; 46: 57–62.

- Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci.* 2000; 58: 99–111.
- Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol Reprod Dev.* 2001; 59: 451–458.
- Chatterjee S, De Lamirande E, Gagnon C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: Protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev.* 2001; 60: 498–506.
- Cheshmedjieva SB, Dimov VN. Effect of freezing on phospholipid distribution of buffalo spermatozoa plasma membranes. In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA, editors. *Proceedings of 4th World Buffalo Cong, Sao Paulo, Brazil.* Roma, Italy, International Buffalo Federation. 1994; 519–521.
- Chinnaiya GP, Ganguli NC. Acrosomal damage of buffalo spermatozoa during freezing in extenders. *Zbl Vet Med A.* 1980; 27: 339–342.
- Chinnaiya GP, Ganguli NC. Effect of age and season on the initial attributes and preservability of buffalo bull semen. *Recent Advances in Buffalo Research.* 1990; 3; 80–86.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2008; 26: 249-261.
- Comaschi V, Lindner L, Farruggia G, Gesmundo N, Colombi L, Masotti L. An investigation on lipoperoxidation mechanisms in boar spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 158: 769–75.
- Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1998; 59: 7-11.
- Crudeli GA, Maldonado SM, Barbaran F. Reproductive evaluation of male buffalo in the Argentina North-Eastern. *Proceedings 5th World Buffalo Congress, Caserta, Italy.* 1997; 865-868.
- Cummins JM, Jequier AM, Kan R. Molecular biology of human male infertility: Linked with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? *Mol Reprod Dev.* 1994; 37: 345-62.
- Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology.* 1977; 14: 466-470.
- Del Sorbo C, Fasano G, Fabbrocini A, Lubrano Lavadera S, Sansone G. Piruvato quale substrato energetico in extenders crioprotettivi. Effetti sulla motilità A allo scongelamento di spermatozoi bufalini *Bubalus Bubalis.* *Proc 7th Meeting Nazionale Studio Sulla Efficienza Riproduttiva Degli Animali Di Interesse Zootecnico Bergamo Italy.* 1995; 1: 585–588.

- Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF. Acrylamide: Its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat Res.* 1988; 195: 45-77.
- Dhami AJ, Kodagali SB. Freezability, enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa in relation to the quality of semen ejaculates and extenders. *Theriogenology.* 1990; 34: 853– 863.
- Dhami AJ, Sahni KL, Mohan G. Effect of various cooling rates (from 3⁰C to 5⁰C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos taurus* and *Bos bubalis* semen. *Theriogenology.* 1992; 38: 565–574.
- Dhami AJ, Sahni KL, Mohan G, Jani VR. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. *Theriogenology.* 1996; 46: 109–120
- Di Berardino D, Iannuzzi L. Chromosome banding homologies in swamp and murrh buffalo. *J Hered.* 1982; 72: 183– 188.
- Donnelly ET, O'connell M, McClure N, Lewis SE. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000; 15(7): 1552-1561.
- Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SEM. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod.* 2001; 16: 1191-1199.
- Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar uva radiation. *Biochemistry.* 2003; 42 (30): 9221–9226.
- Duru NK, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2000; 74: 1200–1207.
- Duncan BK, Miller JH. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature.* 1980; 287(5782): 560-561.
- Ecot P, Vidament M, De Mornac A, Perigault K, Clement F, Palmer E. freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *J Reprod Fertil.* 2000; 56: 141-150.
- El-Kon I, Darwish AS. Effect of glutathione (GSH) on microscopic parameters, DNA integrity in egyptian buffalo semen during liquid and frozen storage. *Journal of Reproduction and Infertility.* 2011; 2 (3): 32-40.
- Eming SA, Morgan JR, Berger A. Gene therapy for tissue repair: Approaches and prospects. *British J Plastic Surg.* 1997; 50: 491-500.

- Ericsson S, Garner ADL, Thomas CA, Downing TW, Marshall CE. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 1993; 39: 1009–1024.
- Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Prinsloo E, Van Rooyen LH. Sperm chromatin packaging as indicator of invitro fertilization rates. *Hum Reprod*. 2000; 15(3): 657-661.
- Evenson D, Darzynkiewicz PZ, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 1980; 210: 1131–1133.
- Evenson DP, Thompson L, Jost L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*. 1994; 41: 637–651.
- Evenson DP, Larson K, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with the other techniques. *J Androl*. 2002; 23: 25-43.
- FAO. Food and agricultural organization of the united nations. [Http://Faostat.Fao.Org/Site/573/Default.Asp#Ancor](http://Faostat.Fao.Org/Site/573/Default.Asp#Ancor). 2010.
- FAO. Food and agricultural organization of the united nations. [Http://Faostat.Fao.Org/Site/573/Desktopdefault.Aspx?Pageid=573#Ancor](http://Faostat.Fao.Org/Site/573/Desktopdefault.Aspx?Pageid=573#Ancor). 2013
- FAO. Food and agricultural organization of the united nations. [Http://Faostat.Fao.Org/Site/573/Default.Asp#Ancor](http://Faostat.Fao.Org/Site/573/Default.Asp#Ancor). 2014
- Fernandez JL, Mouriél L, Rivero MT, Goyanes V, Vasquez R, Alvarez, JL. The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003; 24: 59-66.
- Floyd RA, Watson JJ, Harris J, West M, Wong PK. Formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986; 137: 841-846.
- Ford MD, Lavin MD. Ataxia telangiectasia: An anomaly in DNA replication after irradiation. *Nucleic Acids Res*. 1981; 9(6): 1395-404.
- Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*. 2002; 71: 13–23.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci*. 1990; 87: 4533-4537.

- Fraser L, Strzezek J. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochem Cytobiol.* 2004; 42: 49-55.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Schultz RA. DNA repair and mutagenesis. Washington , Asm Press. 1995; 6-42.
- Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, Kojima K, Kamidono S. Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele. *Fertil Steril.* 1988; 50: 795-800.
- Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online.* 2004; 9: 680–691.
- Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology.* 2004; 62: 690–701.
- Gadea J, Garcia-Vazquez F, Matas C, Gardon JC, CaNovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa. Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl.* 2005; 26: 396–404.
- Gadea J, Gumbao D, Matas C, Romar R. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J Androl.* 2005; 26: 749–56.
- Galli A, Bornaghi V, Balduzzi D, Buttazzoni L, Aleandri R. Sexual behaviour and semen quality relating to Italian Buffalo. *Proc. 3rd World Buffalo Congr. Varna, Bulgaria.* 1993; 1: 562–570.
- Gao D, Mazur P, Critser JK. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive Tissue Banking.* San Diego, Academic Press 1997; 263-327.
- Generoso WM, Cain KT, Krishna M, Cunningham EB, Hellwig CS. Evidence that chromosome rearrangements occur after fertilization following postmeiotic treatment of male-mice germ cells with ems. *Mutat Res.* 1981; 91: 137-140.
- Generoso VM, Cain KT, Bandy AJ. Role of fertilizing eggs in the formation of chromosome aberrations in mutagen-treated germ cells of male mice. In: Ishihara T, Sasaki M, editors. *Radiation Induced Chromosome Damage in Man.* Liss, New York. 1983; 401-409.
- Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet.* 1992; 89:181–186.

- Gerber D, Irons PC, Herold FC, Cooper D. Quality and freezability of epididymal semen from African Buffalo (*Syncerus Caffer*) following prolonged exposure to ambient temperatures or delayed flushing. *Theriogenology*. 2002; 57: 582.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WM. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 2005; 63: 445–457.
- Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1996; 12: 131-147.
- Graham JK. Assessment of sperm quality: A flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*. 2001; 68: 239–247.
- Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*. 1966; 5: 467–477.
- Good NE, Izawa S. Hydrogen ion buffers. *Methods Enzymol*. 1972; 24: 53–68.
- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research*. 1993; 53: 1945-1951.
- Gtmasena KT, Critser JK. Utility of viable tissues ex vivo. In: Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive Tissue Banking*. San Diego, Academic Press. 1997; 1-21.
- Gwo JC, Wu Y, Chang WS, Cheng HY. Evaluation of damage in pacific oyster (*Crassostrea Gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. *Cryo Lett*. 2003; 24: 171-180.
- Haaf T, Ward DC. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Exp Cell Res*. 1995; 219: 604–611.
- Hahn J, Foote RH, Seidel GE. Testicular growth and related sperm output in dairy bulls. *J Anim Sci*. 1969; 29: 41-47.
- Hamamah S, Royere D, Nicolle M, Paquignon M, Lansac J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: A comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod Nutr Dev*. 1990; 30: 59–64.
- Hammerstedt RH, Andrews JC. Metabolic support of Normothermia. In: Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive Tissue Banking*. San Diego, Academic Press. 1997; 139-166.
- Halliwell B, Aruoma OI. DNA Damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *Febs Letters*. 1991; 281(1-2): 9-19.

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th edn. Oxford, Clarendon Press. 2007.
- Hartmann S, Lacorn M, Steinhardt H. Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chem.* 1998; 62: 7–20.
- Hasan S, Andrabi SMH, Muneer R, Anzar M, Ahmad N. Effects of a new antibiotic combination on post-thaw motion characteristics and membrane integrity of buffalo and sahiwal bull spermatozoa and on the bacteriological quality of their semen. *Pak Vet J.* 2001; 21: 6–12.
- Herold FC, Aurich LE, Gerber D. Epididymal sperm from the african buffalo (*Syncerus Caffer*) can be frozen successfully with Andromed[®] and with Triladyl[™] but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology.* 2004a; 61: 715–724.
- Herold FC, de Haas K, Cooper D, Colenbrander B, Nöthling JO, Theunisen W, Spillings B, Gerber D. Comparison of three different media for freezing of epididymal sperm from the african buffalo (*Syncerus Caffer*) and influence of equilibration time on the post-thaw sperm quality. *Onderstepoort Journal Of Veterinary Research.* 2004b; 71: 203–210
- Herold FC, De Haas K, Colenbrander B, Gerber D. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African Buffalo (*Syncerus Caffer*) Using Triladyl[™] or Andromed[®]. *Theriogenology.* 2006; 66: 1123–1130.
- Hiemstra SJ. Guidelines for the constitution of national cryopreservation programmes for farm Animals. In: Publication No. 1 of the European Regional Focal Point on Animal Genetic Resources. Lelystad, Netherlands. 2003; 30.
- Hiron MH, Singh LP, Arangasamy A, Ansari MR, Kumar S. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 2006; 93: 124–133.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci.* 2000a; 62: 3–22.
- Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology.* 2000b; 53: 47–58.
- Hopkins SM, Armstrong DL, Hummel SKC, Junior S. Successful cryopreservation of gaur (*Bos Gaurus*) epididymal spermatozoa. *Journal of Zoo animal Medicine.* 1988; 19: 195–201.
- Hu JH, Li QW, Jiang ZJ, Li WY. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Cryobiol.* 2008; 57: 257–262.

- Hughes CM, Lewis SE, Mckelvey-Martin VJ, Thompson W. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res.* 1997; 374(2): 261–268.
- Ibrahim SS, El-Azab AI, Racka AM, Soliman FA. The physico-chemical characteristics of the pre-ejaculate fraction, whole semen and the seminal plasma in buffalo bulls. *Proc 1st World Buffalo Congress, Cairo Egypt.* 1985; 1: 1042–1051.
- Ibrahim NS, Al-Sahaf MMH, Alwan AF. Reproductive activity of mature Iraqi bull buffaloes: Testes dimensions and histological picture. *International Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2013; 5(1): 34-37.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon E, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. *J Androl.* 2000; 21: 33-44.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. Integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. *J Androl.* 2000; 21: 33-44.
- Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod.* 2004; 19: 932-939.
- Jain YC, Anand SR. The lipids of buffalo spermatozoa and seminal plasma. *J Reprod Fert.* 1976; 47: 255–260.
- Jain MC, Arora N. Glutathione concentration in the semen of cow and buffalo bulls. *Cell Mol Biol.* 1988; 34: 127–133.
- Jainudeen MR, Hafez ESE. Cattle and buffalo. In: Hafez ESE, editor. *Reproduction in Farm Animals.* 6th Ed Lea and Febiger, Philadelphia, USA. 1993; 315–329.
- Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ, Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest.* 1993; 69(3): 261-274.
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology.* 2001; 55: 947–961.
- Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 1989; 24: 185–196.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim reprod Sci.* 2000; 62: 143-172.

- Kadirvel G, Kumar C, Kumaresan A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science*. 2009; 114:125–134.
- Karow AM. Pharmacological interventions in vitro. In: Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive Tissue Banking*. San Diego, Academic Press. 1997; 167-227.
- Kılıç S. Kseroderma pigmentozum. *Güncel Pediatri*. 2004; 2 : 137-139.
- Keith JE, Morrison JF. Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol*. 1981; 87: 405–426.
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Annström G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mutat N Res*. 1996; 363: 89.
- Koonjaenak SA, Kunavongkrit V, Chanatinart S, Sirivaidyapong T, Pinyopumotr Rodriguez-Martinez H. Semen quality of Thai swamp buffalo artificial insemination bulls: Comparison of production data from 1988-1993, 2001-2004 and 2004-2005. *Buffalo J*. 2006; 22: 1–9.
- Koonjaenak SV, Chanatinart S, Aiumlamai T, Pinyopumotr Rodriguez-Martinez H. Seasonal variation in semen quality of swamp buffalo bulls (*Bubalus Bubalis*) in Thailand. *Asian J Androl*. 2007; 9: 92–101.
- Koonjaenak S, Johannisson A, Pongpeng P, Wirojwuthikul S, Kunavongkrit A, Rodriguez- Martinez H. Sasonal variation in nuclear DNA integrity of frozen–thawed spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus Bubalis*). *J Vet Med A*. 2007; 54; 377–383
- Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM, Holt WV. Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus Fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine. *Cryobiology*. 2003; 46: 43-52.
- Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM, Holt WV. Effect of DNA repair inhibitor (3-Aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus Fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology*. 2004; 61: 1661-1673.
- Kreul W, Sarıcan C. Türkiye'de manda Yetiştiriciliği. *Hasad Dergisi*. 1993; 8: 95.
- Kumar S, Sahni KL, Mohan G. Effect of different levels of glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J*. 1992; 8: 151–156.
- Kumar S. Sahni KL, Benjamin BN, Mohan G. Effect of various levels of yolk on deep freezing and storage of buffalo semen in different diluters without adding glycerol. *Buffalo J*. 1993; 1: 79–85.

- Kumar S, Sahni KL, Bistha GS. Cytomorphological characteristics of motile and static semen of buffalo bulls. *Buffalo J.* 1993; 2: 117–127.
- Kumar A, Singh LP, Hiron MH, Majumdar AC. Seminal plasma non-heparin binding proteins (NHBP) reduce the cryoinjury to buffalo cauda epididymal spermatozoa induced by heparin binding proteins (HBP). *Animal Reproduction Science.* 2008; 104: 220–226.
- Kumar R, Jagan Mohanarao G, Arvind, Atreja SK. Freeze–thaw induced genotoxicity in buffalo (*Bubalus Bubalis*) spermatozoa in relation to total antioxidant status. *Mol Biol Rep.* 2011; 38: 1499–1506.
- Kumaresan A, Ansari MR, Abhishek G. Modulation of post-thaw sperm functions with oviductal proteins in buffaloes. *Anim Reprod Sci.* 2005; 90: 73–84.
- Küçükkebabçı M, Aslan S. Evcil dişi mandaların üreme özellikleri. *Lalahan Hayv Araşt Enst Derg.* 2002; 42(2): 55-63.
- Lambrechts H, Van Niekerk FE, Coetzer WA, Cloete SW, Van Der Horst G. The Effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus Caffer*) spermatozoa. *Theriogenology.* 1999; 52: 1241-1249.
- Laval F. Induction of proteins involved in the repair of alkylated bases in mammalian cells by DNA-damaging agents. *Mutat Res.* 1990; 233(1-2): 211-218.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and Storage of doat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62: 113- 141.
- Lei CZ, Zhang W, Chen H, Lu F, Liu RY, Yang XY, Zhang HC, Liu ZG, Yao LB, Lu ZF, Zhao ZL. Independent maternal origin of chinese swamp buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Animal Genetics.* 2007; 38: 97–102.
- Leopardi P, Villani P, Cordelli E, Siniscalchi E, Veschetti E, Crebelli R. Assesment of the in vivo genotoxicity of vanadate. Analysis of micronuclei on DNA damage induced in mice by oral exposure. *Toxicol Lett.* 2005; 158: 39-49.
- Lopes S, Jurisicova A, Caper RF. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998a; 13: 703–708.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality semen samples and correlates with failed fertilization in a cytoplasmic sperm injection. *Fertil and Steril.* 1998b; 69: 528–532.
- Malfatti A, Barbato O, Todini L, Terzano GM, Debenedetti A, Borghese A. Blood testosterone levels in Italian mediterranean buffalo bulls managed in two different breeding conditions. *Theriogenology.* 2006; 65: 1137–1144.

- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A₃ accessibility. *Biol Reprod.* 1995; 52: 864-867.
- Marmur J, Grossman L. Ultraviolet light induced linking of deoxyribonucleic acid strands and its reversal by photoreactivating enzyme. *Proc Natl Acad Sci.* 1961; 47: 778-787.
- Marshall CE. Considerations for cryopreservation of semen. *Zoo Biol.* 1984; 3: 343-356.
- Matsuda Y, Tobari I. Repair capacity of fertilized mouse eggs for x-ray damage induced in sperm and mature oocytes. *Mutat Res.* 1989; 210: 35-47.
- Maxwell WM, Long CR, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.* 1998; 10: 433-440.
- McCool CJ, Entwistle KW. Reproductive function in the Australian swamp buffalo bull: Age effects and seasonal effects. *Theriogenology.* 1989; 31(3): 583-594.
- McEntee K. The male genital system. In: *Pathology of domestic animals.* 2nd ed. Academic Press, New York. 1970.
- McKenna DJ, Mckeown SR, Mckelvey-Martin VJ. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis.* 2008; 23: 183-190.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation. Why Is It Better? *Theriogenology.* 2002; 57: 327-344.
- Meltem M. DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. *Türk Biyokimya Dergisi.* 2003; 28 (1): 20-24.
- Mohan G, Sahni KL. Efficiency of semen production in buffalo bulls. In: Acharya Rm, lokeshwar rr, kumar S, editors. *Recent Advances in Buffalo Research.* 1990; 3: 14-16.
- Molla M, Selles E, Marco MA, Remohi J, Ballesteros A, Gadea J. Freezing procedure produces a reduction in the human spermatozoa glutathione content. *J Androl.* 2004; 25(Suppl): 45.
- Morris GJ, Clarke AG. Cells at low temperatures. In: Grout BWW, Morris GJ, editors. *The Effects Of Low Temperatures On Biological Systems.* Edward Arnold, London. 1987; 72-119.

- Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 2002; 17(4): 990-998.
- Mudgal V. Reproduction in river buffaloes. In: Tulloh, NM, Holmes JHG, editors. *Buffalo Production*. New York, Elsevier. 1992. 171-181.
- Muer SK, Roy SB, Mohan G, Dhoble R. Cryogenic changes in seminal protein of cattle and buffalo. *Theriogenology.* 1988; 30: 1005–1010.
- Muralidhara KD. Genotoxic consequences associated with oxidative damage in testis of mice subjected to iron intoxication. *Toxicology.* 2005; 206: 169-178.
- Müller-Schlösser F, Aires V, Hinsch E, Hinsch KD. Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk-free semen diluters for cryopreservation of bovine semen. 34. Jahrestagung Über Physiologie und pathologie der fortpflanzung. Giessen. 2001; 54.
- Nair SJ, Brar AS, Ahuja CS, Sangha SP, Chaudhary KC. Comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim Reprod Sci.* 2006; 96: 21-29.
- Nanda AS, Nakao T. Role of Buffalo In the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus. *Animal Science Journal* 2003; 74: 443–455.
- Nandre RM. Effect of preservation of spermatozoa at sub-zero temperature on DNA integrity by comet assay. Department of Animal Biotechnology College of Veterinary Science and Animal Husbandry Anand Agricultural University, Anand, Gujarat, Master of Veterinary Science, 2007; 21-51.
- Nandre RM, Derashri H, Joshi C. Evaluation of buffalo bull spermatozoal DNA damage using single cell gel electrophoresis. *International Journal of Life Science & Pharma Research.* 2001; 1(1): 38-43.
- Nastri MJF, Del Sorbo C, Fabbrocini A, Fasano G, Sansone G. Performances motility in cooled and freeze thawed B. Bubalis spermatozoa at different osmotic pressures. In: Bradley M, Cummins JM, editörs. *Proc of 7th Int Symp Spermatology*, Cairns, Australia. Australian Society Of Reproductive Biology. 1994; 99–100.
- Neely JD, Johnson JD, Dillard EU, Robison OW. Genetic parameters for testes size and sperm number in hereford bulls. *J Anim Sci.* 1982; 55: 1033-1040.
- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damade and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89: 3030-3034.

- Nour AMM. Viability of deep frozen semen in different diluents in Egypt. Mvsc Thesis Cairo Univ, 1980.
- Ohashi OM. Estrous detection in buffalo cow. *Buffalo J.* 1994; 10: 61-64.
- Ohshima H, Barthsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors. Possible Role Of Nitric Oxide In Carcinogenesis. *Mutat Res.* 1994; 305: 253-264.
- Olive PL, Banath JP, Durand PE. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *Natl J Cancer Inst.* 1990; 82: 779.
- Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.* 1990; 122: 86.
- Olive PL, Trotter T, Banáth JP, Jackson SM, Le Riche J. Heterogeneity in human tumour hypoxic fraction using the comet assay. *Br J Cancer.* 1996; 74: 191–195.
- Olive PL. The Comet Assay. An overview of techniques. In situ detection of DNA damage. *Methods In Molecular Biology.* 2002; 203: 179-194.
- Osheroff WP, Jung HK, Beard WA, Wilson SH, Kunkel TA. The fidelity of DNA polymerase during distributive and processive DNA synthesis. *J Biol Chem.* 1999; 274: 3642- 3650.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123: 291–298.
- Pagano G, De Biase A, Deeva IB, Degan P, Doronin YK, Iaccarino M, Oral R, Trieff NM, Warnau M, Korkina LG. The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sci.* 2001; 68: 1735-1749.
- Pant HC, Sharma RK, Patel SH, Shukla HR, Mittal AK, Kasiraj R, Misra AK, Prabhakar JH. Testicular development and its relationship to semen production in murrah buffalo bulls. *Theriogenology.* 2003; 60(1): 27-34.
- Parks JE, Arion JA, Foote RH. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 1987; 37: 1249–1258.
- Parks JE. Hypothermia and mammalian gametes. In: Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive tissue banking.* San Diego, Academic Press. 1997; 229-261.
- Patrizio P, Silber S, Ord T, Balmaceda JP, Asch RH. Two births after microsurgical sperm aspiration in congenital absence of vas deferens. *Lancet.* 1988; 2: 1364.

- Pederson RA, McLaren A, First N. Animal applications of research in mammalian development. *Current Communications In Cell & Molecular Biology Iv*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (Eds) (1991).
- Perera BMAO. A review of experiences with oestrous synchronisation in buffaloes in Sri Lanka buffalo. *J Suppl*. 1987; 1: 105–114.
- Perera BMAO. Reproduction in water buffalo: Comparative aspects and implications for management. *J Reprod Fertil Suppl*. 1999; 54: 157–168.
- Perera BMAO. Reproductive cycles of buffalo. *Animal Reproduction Science*. 2011; 124: 194–199.
- Perera BMAO, De Silva LNA, Kuruwita VY, Karunaratne AM. Postpartum ovarian activity, uterine involution and fertility in indigenous buffaloes at a selected village location in Sri Lanka. *Anim Reprod Sci*. 1987; 14: 115–127.
- Perera BMAO, Abeygunawardena H, Vale WG, Chantalakhana C. Buffalo. In: Owen E, Kitayi A, Jayasuriya N, Smith T, editors. *Livestock And Ealth Creation–Improving The Husbandry Of Animals Kept By Poor People In Developing Countries*. Nottingham, Livestock Production Programme Natural Resources International Limited. 2005; 451–471.
- Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey JL. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl*. 2004; 25: 224–233.
- Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol App Pharmacol*. 2005; 202: 189-198.
- Phillips PH, Lardy HA. A yolk-buffer pablum for the preservation of bull semen. *J Dairy Sci*. 1940; 23: 399-404.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification at low temperatures. *Nature*. 1949; 164: 666.
- Polge C, Rowson LEA. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C. *Nature*. 1952; 169: 626.
- Potts RJ, Notarianni LJ, Jefferies TM. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat Res*. 2000; 447: 249-256.
- Presicce GA, De Santis G, Stecco R, Senatore E, De Mauro GJ, Terzano GM. Foetal gender determination by ultrasound in the mediterranean Italian Buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Theriogenology*. 2001; 55: 532.

- Presice GA. Reproduction in the water buffalo. *Reprod Dom Anim.* 2007; 42: 24-32.
- Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res.* 2006; 63: 215-225.
- Ramakrishnan P, Ariff MO. Effect of glycerol level and cooling rate on post-thaw semen quality of malaysian swamp buffalo. In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA, Proc of 4th World Buffalo Cong Sao Paulo Brazil. International Buffalo Federation. Roma, Italy. 1994; 540–542.
- Randerath K, Zhou GD, Monk SA, Randerath E. Enhanced levels in neonatal rat liver of 7, 8-Dihydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosine (8-Hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion. *Carcinogenesis.* 1997; 18: 1419-1421.
- Rao AVN, Haranath GB, Sekharam GS, Rao JR. Effect of thaw rates on motility, survival and acrosomal integrity of buffalo spermatozoa frozen in medium french straws. *Anim Reprod Sci.* 1986; 12: 123–129.
- Rattan PJS. Physico–chemical constituents of buffalo bull semen. In: Acharya RM, Lokeshwar RR, Kumar S, editors. *Recent Advances in Buffalo Research.* 1990; 3: 26–30.
- Robinson JJ, Mcevoy TG. Biotechnology – the possibilities. *Animal Production.* 1993; 57: 335-352.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *Journal of Chromatography B.* 1999; 722: 225–254.
- Rosenstein BS, Jonathan M. Ducore. Induction of DNA strand breaks in normal human fibroblasts exposed to monochromatic ultraviolet and visible wavelengths in the 240–546 nm range. *Photochemistry and Photobiology.* 1983; 38 (1): 51–55.
- Roy A, Srivastava RK, Pandey MD. Deep freezing of buffalo semen diluted and preserved in glycine-egg yolk medium. *Indian J Dairy Sci.* 1956; 9: 61–62.
- Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, Barthelemy C, Lansac J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: Fluorescence acridine orange staining and feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res.* 1988; 21: 51–57.
- Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells, In: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF, editors. *DNA Repair Mechanisms,* Academic Press, New York. 1978, 465.
- Saacke RG. Semen quality: Importance of and influencing factors. In: *Proceedings of 10th Naab Tech Conf AI Reprod.* Milwaukee, USA, National Association Of Animal Breeders Columbia. 1984; 30–36.

- Saeed A, Chaudhry RA, Khan IH, Khan NU. Morphology of semen buffalo bulls of different age groups. In: Acharya RM, Lokeshwar RR, Kumar S, editors. *Recent Advances in Buffalo Research*. 1990; 3: 17–19.
- Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ, Sikka SC. *Fertil and Steril*. 2005; 83(1): 95-103.
- Sailer B, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl*. 1995; 16: 80-87.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi P, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999; 4: 31–37.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*. 2002; 66: 1061–1070.
- Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 62: 77–111.
- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Evenson DP. Negative effects of sperm nuclear DNA damage on the fertility potential of couples with idiopathic and male-factor infertility. *Fertil and Steril*. 2002; 78: 61.
- Sansone G, Nastri MJF, Fabbrocini A. 2000: Storage of buffalo (*Bubalus Bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 62: 55–76.
- Sarıözkan S. Türkiye’de manda yetiştiriciliğinin önemi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2011; 17 (1): 163-166.
- Sawa T, Ohshima H. Nitrate DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric Oxide*. 2006; 13: 628-641.
- Sega GA. Unscheduled DNA synthesis in the germ cells of male mice exposed “In Vivo” to the chemical mutagen ethyl methanesulfonate. *Proc Natl Acad Sci*. 1974; 71: 4955–4959.
- Sega GA, Sotomayor RE, Owens JG. A study of unscheduled DNA synthesis induced by x-rays in the germ cells of male mice. *Mutat Res*. 1978; 49: 239–257.
- Seren E, Parmeggiani A, Campanile G. The control of ovulation in Italian Buffalo. In: Enne G, Greppi GF, Lauria A, editors. *Reproduction and Animal Breeding Advances and Strategy*. Elsevier Amsterdam. 1995: 265-275.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation. threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. 2005; 20: 3446–3451.

- Sharma AK, Gupta RC. Epididymal sperm reserve in buffalo bull (*Bubalus Bubalis*). *Andrology*. 1978; 10: 479.
- Sharma AK, Gupta RC. Estimation of daily sperm production rate (DSPR) by quantitative testicular histology in buffalo-bulls (*Bubalus Bubalis*). *Archives of Andrology*. 1979; 3: 147-152.
- Sharma RK, Said T, Agarwal A. (2004). Sperm DNA damage and clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl*. 2004; 6: 139- 148.
- Sharma M, Singh M, Kapoor S, Jasial S. Inter relationship between some routine semen evaluation parameters in Jersey X local hill cattle crossbred bulls. *Open Veterinary Journal*. 2012; 2: 26-31.
- Shannon P. The effect of egg yolk level and dose rate of semen diluted in caprogen. *Proceedings of 7th Int Cong Anim Reprod AI Munich Germany. International Congress On Animal Reproduction And Artificial Insemination, Milan, Italy. 1972; 1440–1442.*
- Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci*. 1989; 86: 9697-9701.
- Shigenaga MK, Ames BN. Assay for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 1991; 10: 211-216.
- Shukla MK, Misra AK. Effect of bradykinin on murrah buffalo (*Bubalus Bubalis*) semen cryopreservation. *Anim Reprod Sci*. 2007; 97: 175–179.
- Simula AP, Priestly BG. Species differences in the genotoxicity of cyclophosphamide and styrene in three in vivo assays. *Mutat Res*. 1992; 271: 49-58.
- Singh LP, Hiron MH, Ansari MR. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2007; 99: 395–400.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider LE. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175: 184.
- Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD, Schneider EL. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res*. 1989; 184: 461–470.
- Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil and Steril*. 2003; 80(6): 1420-1430.

- Sosa GA, El-Deeb ED, El-Sabagh KM. Interactions of diluents, cryoprotective agents and straw filling capacity on quality and fertilizing ability of buffalo semen. *Vet Med J Giza*. 2003; 51: 553–566.
- Soysal İ. Manda ve ürünleri üretimi. Tekirdağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Ders Notları, Tekirdağ. 2009.
- Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SE. A Comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Moluculer Human Reproduction*. 1999; 5(9): 831-835.
- Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation. Comparison between two extenders. *Theriogenology*. 2007; 67: 1249–1255.
- Sukhato PM, Amornruji V, Chanatinart B, Sanithvong R. Uangvachanitgul. Swamp buffaloes semen characteristics during differnt seasons of the years: A sperm morphology study. Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand. 1988; 194–203.
- Sukhato P, Thongsodseang S, Utha A, Songsasen N. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2001; 67: 69–77.
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Deletion of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm. Correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1997; 56:602–607.
- Şekerden Ö, Borghese A, Köroğlu M, Uras H, Güzey YZ. Anadolu mandalarında sun’i tohumlama çalışmaları ve prid (progesterone releasing intravaginal device) uygulamanın döl tutma oranı üzerine etkisi. *Tarım Bilimleri Dergisi*. 2005; 11(2): 126-128.
- Tahir MN, Bajwa MA, Latif M, Mushtaq M, Shah MH. Effects of insemination dose and season on conception rates in buffaloes. *Pak Vet J*. 1981; 1: 161–163.
- Takahashi M, Saka N, Takahashi H, Kanai Y, Schultz RM, Okano A. Assessment of DNA damage in individual hamster embryos by comet assay. *Mol Reprod Dev*. 1999; 54: 1–7.
- Tatham B. Increasing buffalo production; using reproduction technology. Report Rural Indust Res Dev Corp. Kingston Act, Australia. 2000.
- Tekin N. Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. Alaçam E, editor. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun’i Tohumlama, Doğum ve Infertilite*. Dizgievi, Konya. 1994; 67-79.

- Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh KP. Biological Reactive Intermediates. In: Witner CR, Snyder RR, Jollow DJ, Kalf JF, Kocsis IJ, Sipes IG, editors. *Molecular and Cellular Effects and Their Impact On Human Health*, Plenum Press, New York. 1991, 157.
- Tice RR, Strauss GHS. The single cell gel electrophoresis/comet assay: A potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells*. 1995; 13: 207.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2008, 35: 206-221.
- Tuli RK, Singh M, Matharoo JS. Effect of different equilibration times and extenders on deep freezing of buffalo semen. *Theriogenology*. 1981; 16: 99-104.
- Turner TT, Reich GW. Cauda epididymal sperm motility: A comparison among five species. *Biology of Reproduction*. 1985; 32: 120–128.
- Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. *FÜ Sağlık Bil Dergisi*. 2006; 20(1): 85-95.
- Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998; 13: 1864 –1871.
- Usmani RH, Dailey RA, Inskeep EK. Effects of limited suckling and varying prepartum Nutrition on postpartum reproductive traits of milked buffaloes. *J Dairy Sci*. 1990; 73: 1564–1570
- Ünal A. Üriner sistem kanser hastalarında cerrahi tedavi öncesi ve sonrası idrar 8-Hidroksideguanozin (8-Ohdg) Seviyeleri. [Http://www.Acikarsiv.Gazi.Edu. Tr/ Index.Php?Menu=2&Secim=10&Yayinbik=564#](http://www.Acikarsiv.Gazi.Edu.Tr/Index.Php?Menu=2&Secim=10&Yayinbik=564#). 2007.
- Vale WG. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen of buffalo semen. *Buffalo J*. 1994; 65–72.
- Vale WG. The buffalo production in the Amazon Valley. In: *International Symposium on Buffalo Products*, EAAP Publication No 82, Wageningen The Netherlands, Wageningen Press. 1996; 99–116.
- Vale WG. News on Reproduction Biotechnology in Males. In: *Proceedings of the Vth World Buffalo Congress*, Caserta Italy, 1997; 103–123.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Inter*. 2006; 160: 1-40.

- Van Den Berg JCT. Strategy for dairy development in the tropics and subtropics. Wageningen, Netherlands, Centre For Agricultural Publishing And Documentation (Pudoc). 1990.
- Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62: 23–53.
- Waheed S, Ahmad N, Rahman NU, Rahman HJU, Younis M, Iqbal S. Evaluation of duck egg yolk for the cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull semen. *Animal Reproduction Science.* 2012; 131: 95–99.
- Wales RG, White IG. The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. *J Endocrinol.* 1959; 19: 211–220.
- Ward WS. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod.* 1993; 48: 1193-1201.
- Watson PF. The preservation of semen in mammals. In: Finn CA, editor. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 1st Edn Oxford Univ Press Oxford. 1979; 283–350.
- Watson PF, Kunze E, Cramer P, Hammerstedt RH. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fow and bull spermatozoa. *J Androl.* 1992; 13: 131–138.
- Wells PG, Winn LM. Biochemical Toxicology of chemical teratogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1996; 31(1): 1-40.
- White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation. *Reprod Fert Dev.* 1993; 5: 639–658.
- Wilmut I, Haley CS, Woolliams JA. Impact of biotechnology on animal breeding. *Animal Reproduction Science.* 1992; 28: 149-162.
- Xu XR, Zhu JQ, Ye T, Wang CL, Zhu YF, Dahms HU, Jin F, Yang WX. Improvement of single-cell gel electrophoresis (SCGE) alkaline comet assay. *Aquat Biol.* 2013; 18: 293–295.
- Xu DX, Zhu QX, Zheng LK, Wang QN, Shen HM, Deng LX, Ong CN. Exposure to acrylonitrile induced DNA strand breakage and sex chromosome aneuploidy in human spermatozoa. *Mutat Res.* 2003; 537: 93-100.
- Zicarelli L. Buffalo milk Production world-wide. VI World Buffalo Congress. 2001; 1: 202–230.
- Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil and Steril.* 2001; 75: 674-677.

Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl.* 1993; 16: 183–188.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Eser AKAL

Doğum Yeri: Kırıkkale

Doğum Tarihi: 04.04.1984

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans Mezuniyeti, Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi 2002 – 2007.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü, 2009 - 2014

E-posta: eserakal@omu.edu.tr
akalioglueser@hotmail.com