



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI**

**EPİDİDİMAL MANDA SPERMASININ
DONDURULMASINDA SPERMAYA KATILAN FARKLI
SULANDIRICILARIN SPERMATOLOJİK PARAMETRELER
ÜZERİNE ETKİSİNİN İN-VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Doktora Tezi

Emre DEMİRCİ

Danışman
Doç. Dr. Murat SELÇUK

SAMSUN
2021

**T. C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI**



**EPİDİDİMAL MANDA SPERMASININ
DONDURULMASINDA SPERMAYA KATILAN FARKLI
SULANDIRICILARIN SPERMATOLOJİK PARAMETRELER
ÜZERİNE ETKİSİNİN İN-VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Doktora Tezi

Emre DEMİRCİ

**Danışman
Doç. Dr. Murat SELÇUK**

**SAMSUN
2021**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

15/01/2021
Emre DEMİRCİ

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Epididimal Manda Spermasının Dondurulmasında Spermaya Katılan Farklı Sulandırıcıların Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisinin İn-Vitro Değerlendirilmesi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 18/01/2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 8

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

İmza
19/01/2021
Doç. Dr. Murat SELÇUK

ÖZET

EPİDİDİMAL MANDA SPERMASININ DONDURULMASINDA SPERMAYA KATILAN FARKLI SULANDIRICILARIN SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİNİN İN-VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Emre DEMİRCİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Dölerme ve Suni Tohumlama (Veteriner) Ana Bilim Dalı

Doktora, Şubat/2021

Danışman: Doç. Dr. Murat SELÇUK

Yapılan bu araştırmanın amacı, mezbahanelerden kesim sonrası alınan manda testislerinden elde edilen epididimal spermalarda çeşitli sperma sulandırıcıları kullanarak dondurmanın bazı spermatolojik parametreler üzerine etkisinin incelenmesidir. Samsun il ve ilçe mezbahanelerinden kesim sonrası alınan 15 adet erkek Anadolu mandası (3 yaş ve üzeri) testislerinden elde edilen epididimal spermalara 6 farklı sperma sulandırıcısı katarak yapılan spermatolojik muayenelerle spermatozoaların progresif motilitesi (%), ölü/canlı spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı ve Hipo Osmotik Şişme Testi (HOST) oranı (%) saptandı. Araştırmada taze sperma ile çözüm sonu sperma progresif motilitesi, ölü spermatozoa oranı, HOST oranı, orta kısım anomalisi, kuyruk anomalisi ve toplam anomali oranları arasında önemli ($p < 0,001$) farklılıkların olduğu saptandı. Sulandırıcılar arasında ise taze progresif motilitede Tris (% $55 \pm 2,71$), dondurma çözündürme sonrasında ise Tris ve Optixcell® (% 6) diğer sulandırıcılara göre daha iyi sonuçlar verdi. Ölü spermatozoon oranında da Tris, taze ve dondurma çözündürme sonrası sırasıyla % $22 \pm 0,98$ ve % $65,30 \pm 2,94$ ile diğer sulandırıcılara göre en iyi sonucu verdi. Anormal spermatozoonunda ise en fazla toplam anomali veren sulandırıcı taze ve dondurma çözündürme sonrası sırasıyla % $29,86 \pm 0,85$ ve % $36,86 \pm 0,70$ sonuçlarını veren Bioxcell® sulandırıcısı oldu. HOST oranlarına bakıldığında taze spermada en iyi sonucu Tris sulandırıcısı (% $63,40 \pm 0,78$) verirken, dondurma çözündürme sonrası sulandırıcılar arasında anlamlı derece bir fark gözlemlenmedi ($P > 0,05$). Çalışmamızda kullanılan sperma sulandırıcıları arasında spermatolojik parametreler göz önüne alındığında Tris sulandırıcısının en iyi sonuçları veren sperma sulandırıcısı olduğu görülmektedir. 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.

Anahtar Sözcükler: Dondurma, Epididimal, Manda, Sperma, Sulandırıcı.

ABSTRACT

IN-VITRO EVALUATION OF THE EFFECTS OF DIFFERENT EXTENDERS ON SPERMATOLOGICAL PARAMETERS IN THE FREEZING OF EPIDIDIMAL BUFFALOA SPERM

Emre DEMİRCİ

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Reproduction and Artificial Insemination

Ph.D., February/2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat SELÇUK

The aim of this study is to examine the effect of freezing on some spermatological parameters of spermatozoa using various semen diluents in epididymal semen obtained from buffalo testes taken after slaughter from slaughterhouses. Six different semen extender was added to the epididymal sperm obtained from 15 male Anatolian buffalo (3 years old and above) testicles taken after slaughter from Samsun province and district slaughterhouses and progressive motility of spermatozoa (%), dead/live spermatozoa ratio (%), abnormal spermatozoa ratio (%) and Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) rate (%) were determined by spermatological examinations. In the study, significant differences were found between fresh semen and end-solution semen progressive motility, rate of dead spermatozoa, HOST ratio, mid-part anomaly, tail anomaly and total anomaly rates ($p < 0.001$). Among the diluents, Tris (55 ± 2.71) with fresh progressive motility, Tris and Optixcell® (6) after freezing and thawing gave better results than other diluents. In the ratio of dead spermatozoon, Tris gave the best results compared to other diluents with 22 ± 0.98 and 65.30 ± 2.94 , respectively, after fresh and thawing. In abnormal spermatozoa, the diluent that gave the highest total abnormalities was fresh and Bioxcell® diluent, which gave 29.86 ± 0.85 and 36.86 ± 0.70 , respectively, after freezing and thawing. When the HOST ratios were examined, Tris extender (63.40 ± 0.78) gave the best result in fresh semen, while no significant difference was observed between diluents after freezing and thawing ($P > 0.05$). Considering the spermatological parameters among the semen extender used in our study, it is seen that Tris extender is the semen extender that gives the best results. Fresh and thawing progressive motility rates in the obtained epididymal semen were found to be compatible with the studies conducted and it is thought that the epididymal buffalo sperm obtained from post-mortem can be used in biotechnological methods.

Keywords: Buffalo, Epididymal, Extender, Freezing, Sperm.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca tecrübe ve birikimlerinden faydalandığım yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli tez danışmanım Doç. Dr. Murat SELÇUK başta olmak üzere, Prof. Dr. Mesut Çevik'e, Doktor Öğretim Üyesi Eser AKAL'a, Anabilim dalımızda görev yapan Araştırma Görevlileri Burcu ESİN, Cumali KAYA, Melih AKAR, Merve Deniz Genç ve Mustafa NİZAM'a, öğrenim sürem boyunca desteklerini esirgemeyen değerli Atakum İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü Hayvan Sağlığı ekibine ve kıymetli ilçe müdürüme, materyal temini için yardımlarını esirgemeyen Florya Entegre Et Mezbahanesi çalışanlarına, moral motivasyon konusunda beni her zaman destekleyen Hayal Atölyesi Tiyatrosu'na, maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen sevgili annem ve babam Meryem ve İlhan DEMİRCİ'ye, lisans öğrenimim ve doktora öğrenimim boyunca varlığı ile beni onurlandıran, bana güç veren, beni her daim cesaretlendiren, dünyanın en güzel duygusu olan evlat duygusunu Zeynep Tomris ve Peria Ayris'le bana yaşatan, yaşama sebebim değerli eşim Beste DEMİRCİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mandanın Kökeni, Dünya ve Ülkemizdeki Yeri.....	3
2.2. Manda Yetiştiriciliği ve Genel Özellikleri.....	5
2.3. Mandaların Fizyolojik ve Üreme Özellikleri.....	6
2.4. Manda Spermasının Genel Özellikleri ve Spermayı Etkileyen Faktörler.....	9
2.5. Epididimal Manda Spermasının Özellikleri.....	13
2.6. Kriyoprezervasyon ve Etkileri.....	16
2.7. Manda Spermasının Dondurulma Adımları.....	19
2.8. Epididimal Manda Spermasının Sulandırılması ve Dondurulması.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Hayvan Materyali.....	26
3.2. Testislerin Alınması.....	27
3.3. Testislerin Laboratuvara Getirilmesi.....	28
3.4. Spermanın Elde Edilmesi.....	28
3.5. Spermanın Sulandırılması.....	30
3.6. Sulandırılan Spermaların Equilibasyonu ve Dondurma-Çözdürmesi.....	31
3.7. Çalışma Gruplarının Spermatolojik Muayeneleri (Taze, Equilibasyon sonrası ve Dondurup-Çözdürme Sonrası).....	31
3.7.1. Motilite Muayenesi (%).....	31
3.7.2. Ölü/Canlı Spermatozoa Oranı (%).....	31
3.7.3. Anormal Spermatozoa Oranı (%).....	32
3.7.4. Hipo-Ozmotik Şişme Testi (HOST) Oranı (%).....	32

3.8. İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
5. SONUÇ.....	46
6. KAYNAKLAR.....	48
ÖZ GEÇMİŞ.....	55



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde
>	: Büyüktür
<	: Küçüktür
gr	: Gram
lt	: Litre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
mOsm.	: Miliosmoz
min.	: Minimum
maks.	: Maksimum
dk.	: Dakika
sn.	: Saniye
M.Ö	: Milattan Önce
M.S	: Milattan Sonra
HOST	: Hipo-Osmotik Şişme Testi
ST	: Suni Tohumlama
GENMOD	: Genelleştirilmiş Doğrusal Modeller
cm	: Santimetre
P	: P Değeri
P.	: Progresif
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
vb.	: Ve benzeri
Ort.	: Ortalama
CLC	: Cholesterol Loaded Cyclodextrin
IU	: İnternasyonal Ünite

TRIS	: Tris Yumurta Sarısı Gliserol
EYC	: Yumurta Sarısı Sitrat
CAW	: Peynir Altı Suyu Sitrik Asit
TY-G	: Tris Yumurta Sarısı- Gliserol
CAW-G	: Peynir Altı Suyu Sitrik Asit- Gliserol
TYS	: Tavuk Yumurta Sarısı
ÖYS	: Ördek Yumurta Sarısı
SSP	: Sığır Seminal Plazması
YS	: Yumurta Sarısı
BB	: Botu-bov
DMF	: Dimetilformamid

ŞEKİLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Manda Irklarının Sınıflandırması.....	3
Şekil 2. 2. Erkek Üreme Organları.....	7
Şekil 2. 3. Testisin Yapısı.....	8
Şekil 2. 4. Normal ve Anormal Spermatozoon Görselleri.....	15
Şekil 3. 1. Anadolu Mandası.....	26
Şekil 3. 2. Testislerin Elde Edilmesi.....	27
Şekil 3. 3. Epididimislerin Laboratuvara Getirilmesi.....	28
Şekil 3. 4. Spermanın Elde Edilmesi.....	29
Şekil 3. 5. Çalışmada Kullanılan Ticari Sulandırıcılar.....	30

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1. Çeşitli Ülkelerdeki Yıllara Göre Manda Popülasyonu.....	3
Tablo 2. 2. Türkiye ve Dünyadaki Manda Popülasyonu Son 50 Yıl (Baş).....	4
Tablo 2. 3. Mandalarda Reprodüktif Özellikler.....	9
Tablo 2. 4. Manda Spermasına Ait Genel Özellikler.....	10
Tablo 2. 5. Manda Spermasında ve Seminal Plazmasındaki Fiziksel ve Biyokimyasal Parametreler...10	
Tablo 2. 6. Ejaküle ve Epididimal Sperma Arasındaki Farklar.....	16
Tablo 2. 7. Hücrenin Dondurulup-Çözdürülmesi Esnasında Meydana Gelen Hasarların Kaynakları..19	
Tablo 2. 8. Hiron ve Arkadaşlarının Yapmış Olduğu Çalışma Sonuçları.....	24
Tablo 2. 9. Herold ve Arkadaşlarının Yapmış Olduğu Çalışma Sonuçları	24
Tablo 2.10. Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler.....	25
Tablo 4. 1. Farklı Sulandırıcılar ile Sulandırılan Spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Progresif Motilite Bulguları.....	34
Tablo 4. 2. Farklı Sulandırıcılar ile Sulandırılan Spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Ölü Spermatozoon Oranları	35
Tablo 4. 3. Farklı Sulandırıcılar ile Sulandırılan Spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Baş Anormali Oranları	35
Tablo 4. 4. Farklı Sulandırıcılar ile Sulandırılan Spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Orta Kısım Anormali Oranları	36
Tablo 4. 5. Farklı Sulandırıcılar ile Sulandırılan Spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Kuyruk Anormali Oranları	36
Tablo 4. 6. Farklı Sulandırıcılar ile Sulandırılan Spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Toplam Anormali Oranları.....	37
Tablo 4. 7. Farklı Sulandırıcılar ile Sulandırılan Spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Host Bulguları.....	38

1.GİRİŞ

Ülkemizde ve dünyada hızlı nüfus artışı ve ekonomik baskı geleneksel tarım sistemlerindeki değişimi hızlandırırken biyolojik çeşitliliği de büyük oranda azaltmaktadır. Azalan bu biyolojik çeşitlilik sonucu ülkemizdeki bazı hayvan ırkları yok olmuş bazı ırklar da yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmıştır. Bundan dolayı yok olma tehlikesi altında olan yerli ırklar, 28/2/2001 tarihli ve 4631 sayılı Hayvan Islahı Kanunu ile Tarım ve Orman Bakanlığının 17/6/2003 tarihli ve 25141 sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan “Hayvan Irklarının Tesciline İlişkin Yönetmelik’in 12’nci maddesine dayanılarak hazırlanan 2004/39 No’lu Yerli Hayvan Irk ve Hatlarının Tescili Hakkında Tebliğ ile koruma altına alınmıştır. Bu bağlamda özellikle Samsun ve çevresinde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan Anadolu Mandası da koruma kapsamı altına alınan evcil hayvanlar sınıfında yer almıştır.

Anadolu mandası; nehir mandalarının bir alt grubu olan Akdeniz Mandalarından köken almaktadır. Anadolu Mandasının yetiştiricilikte hastalıklara karşı dayanıklı olması, kalitesiz kaba yemi bile et ve süte dönüştürebilmesi, yetiştirme giderlerinin düşük olması, her türlü iklim koşullarına uyum sağlayabilmesi ve alınan hayvansal ürünleri bileşenlerinin diğer türlere göre daha aranan özellikte olması nedeniyle önemi büyüktür (Dellal, 1994). Daha çok ekstansif koşullarda bakım ve beslemesi yapılan Anadolu mandalarının fertilité yönünden zayıf olması damızlık olarak beslenmesinde tercih edilmemesine yol açmaktadır. Bundan dolayı özellikle erkek mandalar belli bir ağırlığa erişince kasaplık olarak değerlendirilmektedir. Mezbahada kesilen değerli damızlıklar ise ıslahta yeteri kadar kullanılamamaktadır. Kesilen hayvanlardan da epididimal sperma elde edilmesi ve hayvan ıslahında kullanılması günümüzde yaygınlaşan bir yöntemdir. Epididimal sperma üzerine yapılan çalışmaların hızla artmasıyla mezbahada kesilmek zorunda kalan hayvanların da ıslah amaçlı kullanımı büyük önem kazanmaktadır.

Mezbahada kesilen hayvanların testislerinden elde edilen spermaların, çeşitli sebeplerden dolayı kesime gönderilen Anadolu mandalarının genetik aktarımının sağlanması açısından büyük önem arz etmektedir. Damızlıklarda kesim sonrası atık ürün olan testislerden damızlık üretiminde kullanılabilecek sperma elde edilmesiyle ülke ekonomisine de katkı sağlanabilecektir.

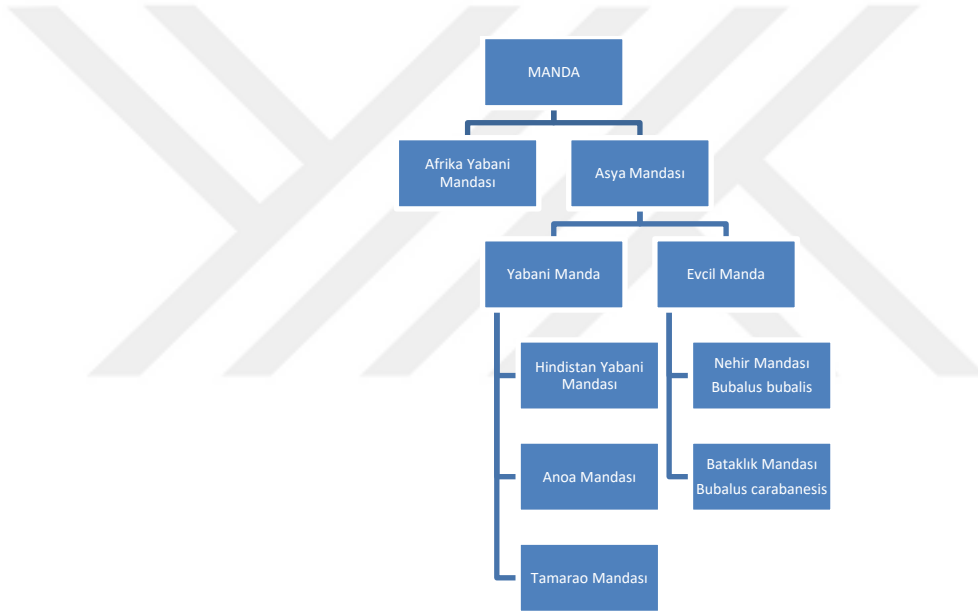
Spermanın dondurulmasında çok sayıda ticari sulandırıcı hazırlanmış ve çoğunlukla boğa sperması üzerinde birçok araştırma yapılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Manda spermasının membranındaki düşük fosfolipit içeriği ve dondurma-çözdürme işlemleri esnasında bu yapının kaybı manda spermasının dondurulabilme kapasitesini zayıflattığı bildirilmiştir (Sansone, et al., 2000). Bu amaçla ejaküle manda spermasının sulandırılarak dondurulması amacıyla birçok çalışma yapılmış olmasına karşın epididimal manda spermasının sulandırılarak dondurulması üzerine yapılan çalışmalar yetersiz kalmıştır. Epididimal manda spermasının kullanımı yapılan çalışmalar ışığında dünyada giderek artmaktadır. Son yıllarda ülkemizdeki manda popülasyonunda hızla artarken, Anadolu mandalarının popülasyon artışına katkı sağlayacak epididimal sperma üzerine yapılan çalışmalar kısıtlı kalmaktadır.

Yapılacak tez çalışmasında, mezbahanelerde kasaplık olarak kesilen ve hayvan ıslahında kullanılamayan Anadolu manda boğalarından elde edilecek epididimal spermalara katılacak farklı içerikteki sulandırıcıların dondurma-çözdürme sonrası in-vitro değerlendirmeleri yapılarak epididimal manda spermasının dondurulmasında en iyi sonuçlara sahip sulandırıcının belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mandanın Kökeni, Dünya ve Ülkemizdeki Yeri

Manda Mammalia (memeliler) sınıfının Artiodactyla (çift toynaklılar) takımının Bovidae (boynuzgiller) familyasında yer alan Bovinae (sığırlar) alt sınıfında yer almaktadır. Bubalus cinsine mensup olan mandalar Afrika Yabani Mandası ve Asya Mandası olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir. Şekil 2.1.'de manda ırklarının sınıflandırılması görsel olarak verilmiştir. Asya mandalarının evcilleştirilmiş olanları da yetiştiricilikteki önemi, verim özellikleri, vücut ölçüsü ve kromozom sayısı gibi farklılıklardan dolayı nehir mandası ($2n = 50$) ve bataklık mandası ($2n = 48$) olarak iki alt gruba ayrılır (Van Den Berg, 1990; Lei, et al., 2007).



Şekil 2.1. Manda Irklarının Sınıflandırması (Van Den Berg, 1990'dan uyarlanmıştır)

Mandaların (*Bubalus bubalis*) M.Ö. 2500-3000 yıllarında uzak doğunun sıcak ve nemli ülkelerinde (Hindistan, Çin gibi) evcilleştirildiği bilinmektedir. Evcil mandalar Mezopotamya'da bu bölgelerden daha sonraları görülmeye başlanmıştır. İlk kayıtlar M.S. 723'te Ürdün bölgesinde ortaya çıkmıştır. Mısır'a Arap devletlerinin fetihleri sayesinde 9. yüzyılda götürülmüştür. Avrupa'ya mandanın gelmesi ve yayılmasının başlıca iki nedeni vardır. İlki Avrupa üzerine seferler yapan Moğollar, ikincisi ise Haçlı seferlerinde mandayı tanıyan Avrupalıların mandayı anayurtlarına götürmesidir (Kök, 1996).

FAO, (2020) yılındaki verilerine göre dünyadaki manda sayısının 200 milyon baştan fazla olduğu ve bu sayının da % 97,4'ünün Asya kıtasında geri kalan mandaların da % 1,6'sı Afrika, % 0,6'sı Amerika ve % 0,2'si Avrupa'da olduğu bildirilmiştir. Dünyadaki manda sayısı sığır sayısının % 0,134'ü kadardır. Günümüzde Antarktika ve Avustralya dışındaki bütün kıtalarda ve 40'tan fazla ülkede farklı sayılarda yapılmakta olan manda yetiştiriciliği Dünya'da en yaygın olarak sırasıyla Hindistan (% 55,2), Pakistan (% 18,8) ve Çin'de (% 13,1) yapılmaktadır. Dünya'da bazı ülkeler ve Türkiye'nin sınır komşularındaki manda sayıları Tablo 2.1.'de gösterilmiştir (FAO, 2020).

Tablo 2.1. Çeşitli ülkelerdeki yıllara göre manda popülasyonu (Baş) (FAO, 2020)

Ülke	2005	2008	2012	2018
Hindistan	101 559 000	106 014 000	108 702 122	114 151 770
Pakistan	26 300 000	29 002 000	32 687 000	38 848 000
Çin	22 365 381	23 271 899	27 415 677	27 118 636
Nepal	4 081 463	4 496 507	5 133 139	5 277 819
Mısır	3 885 000	4 052 649	4 164 928	3 506 061
Brezilya	1 173 629	1 146 690	1 261 922	1 390 066
İtalya	210 000	307 149	348 861	401 337
Irak	213 000	285 537	312 000	215 595
Türkiye	103 900	84 705	97 632	161 439
İran	413 000	191 000	199 000	113 330
Gürcistan	22 000	17 900	17 200	18 361
Bulgaristan	7 973	8 968	9 887	12 809
Suriye	4 470	6 000	7 408	8 000
Yunanistan	1 290	1 643	2 137	9 239
Ermenistan	402	497	472	717
Dünya	177 006 408	185 741 258	196 409 854	206 600 676

Türkiye'de 1961-2011 yıllarında manda popülasyonu 1.140.000 baştan 84.726 başa düşerek büyük bir azalma (% 92,6) görülmesine karşın; 2011-2018 yılları arasında yapılan hayvancılık politikalarıyla manda sayımız 84.726 baştan 161.439 başa yükselerek % 90'dan fazla bir artış meydana gelmiştir. Aynı dönemlerde Dünya'da (1961-2017) manda popülasyonu % 200 den fazla bir artış ile 88.321.807 baştan 206.600.676 başa yükselmiştir (FAO, 2020). TÜİK verilerine göre de 2019 yılında Türkiye'deki manda sayısı 184.192 başa yükselmiştir (TÜİK, 2020). Ülkemiz ve Dünyadaki son 50 yıldaki manda popülasyonu Tablo 2.2.'de verilmiştir (FAO, 2020).

Tablo 2. 2. Türkiye ve dünyadaki manda popülasyonu son 50 yıl (Baş) (FAO, 2020)

	1961	1971	1981	1991	2001	2011	2018
Türkiye	1140000	1117000	1031000	371000	146000	84726	161439
Dünya	88321807	108708343	124212022	149685155	166280398	190407359	206600676

Türkiye’de manda yetiştiriciliği yedi bölgemizde de yapılmakta olup en fazla yetiştiricilik yapılan Karadeniz Bölgesi’nde Samsun, Tokat, Amasya ve Çorum; İç Anadolu Bölgesi’nde Sivas, Kayseri ve Yozgat; Ege Bölgesi’nde Afyon ve Kütahya; Marmara Bölgesi’nde İstanbul, Balıkesir ve Bursa; Doğu Anadolu Bölgesi’nde Muş, Bitlis ve Iğdır; Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde ise Diyarbakır şehrinde yoğun olarak yapılmaktadır. Türkiye’de yetiştirildiği yörelere göre değişik isimlerle anılan manda en çok Su Sığırı, Camış, Camız, Kömüş ve Dombay isimleri ile anılmaktadır (Sarıözkan, 2011; Haybis, 2020).

2.2. Manda Yetiştiriciliği ve Genel Özellikleri

Dünyada evcil ve yabani mandaların 74 ayrı ırkı bulunduğu bildirilmiştir. Evcil mandalar Bataklık ve Nehir (Irmak) mandaları diye ikiye ayrılır. Bataklık mandaları daha çok Çin ve Güneydoğu Asya’da bulunur. Nehir mandalarına oranla süt verimi az olup genellikle tarla sürmek ve et üretimi için yetiştiriciliği yapılmaktadır. Nehir (ırmak) mandaları ise daha çok süt ve et üretmek için kullanılır. Nehir mandaları daha fazla süt verimi olduğundan entansif olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır (Atasever ve Erdem, 2008).

Mandalar sığırlara göre 1/10 oranında daha az ter bezine sahip olmaları ve deri kalınlıklarının (6-7 cm) daha fazla olması nedeniyle, yaşadığı yerde serinlemek amacıyla mutlaka su (göl, gölet, bataklık, ırmak vb.) birikintilerine ihtiyaç duyarlar. Bu yapıları ile semi-aquatik bir özellik gösterirler (Sarıözkan, 2011). 2004 yılında yayınlanan Yerli Hayvan Irk ve Hatlarının Tescili Hakkındaki Tebliği’nde ırka özgü ayırıcı özelliklerinin yetiştirme koşullarının özel karakteristiklerine göre, 0 °C’nin altında ve 30 °C’nin üzerindeki sıcaklıklardan etkilenirler. Sıcakta suya girme ya da çamurda yuvarlanma ihtiyacı duyarlar. Sulak, bataklık ve nemli bölgeleri severler. Nehir mandaları genellikle et ve süt verimi için yetiştirilen kombine ırklardır. Süt Verimi için kullanılan başlıca manda ırkları; Kundi, Murrah, Nili-Ravi ve Pandharpuri’dir. Bataklık mandaları yük taşıma ve et üretimi için yetiştirilir. Başlıca ırkları; Malaii, Baladi ve Saidi’dir. Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan manda ırkları

nehir mandalarının alt grubu Akdeniz Mandasından köken almakta ve ‘‘Anadolu Mandası’’ olarak isimlendirilmektedir (Atasever ve Erdem, 2008).

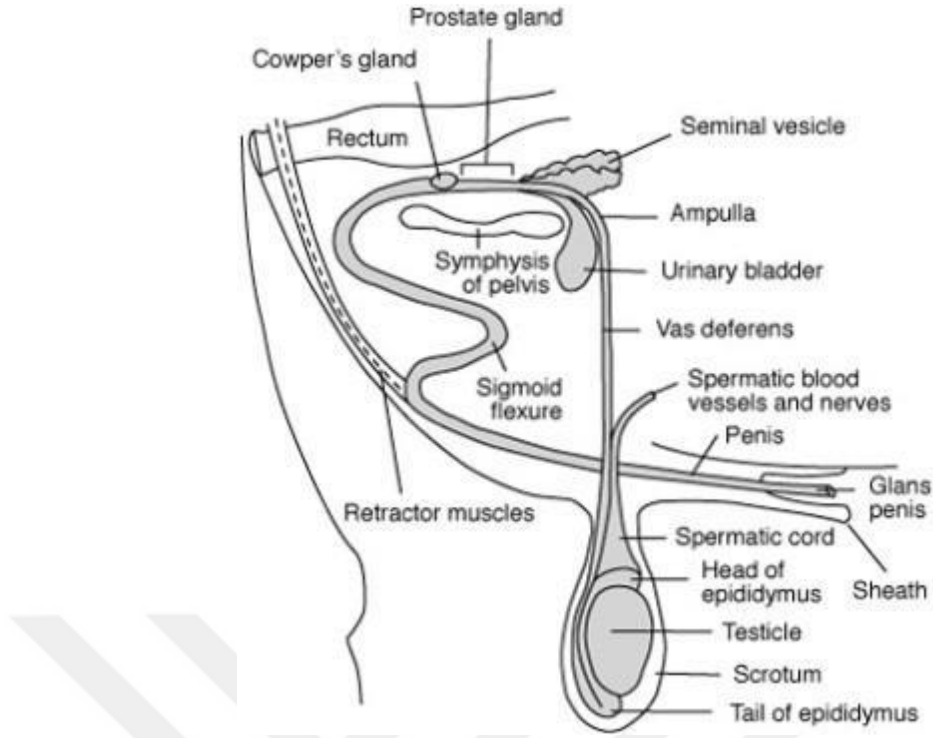
Mandanın yetiştiricilikte sığırlara kıyasla hastalıklara karşı daha dayanıklı olması, kalitesiz kaba yemi bile et ve süte dönüştürebilmesi, mera ve orman altı meralardan çok daha iyi yararlanabilmesi, yetiştirme giderlerinin düşük olması, her türlü iklim koşullarına uyum sağlayabilmesi ve alınan hayvansal ürünleri bileşenlerinin diğer türlere göre daha aranan özellikte olması nedeniyle önemi büyüktür (Küçükkebabcı ve Aslan, 2002; Atasever ve Erdem, 2008; Soysal, vd., 2005).

Manda eti sığır etine oranla daha az kalori daha az yağ ve daha az kolesterol içermesi sebebiyle etinin tüketim için daha sağlıklı olduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda sütteki kuru madde oranı yüksek olup özellikle inek sütüne oranla daha fazla protein, yağ ve laktoz içermektedir (Küçükkebabcı ve Aslan, 2002; Atasever ve Erdem, 2008; Soysal, 2009).

Et ve süt verimini dışında deri sanayinde manda derisi yaygın olarak (çanta, ayakkabı, tasma, yular vb.) kullanılmaktadır. Ayrıca boynuz ve tırnaklarından askılık, küllük, broşlar, kolyeler, küpeler ve bilezikler yapılmaktadır. Mandalardan çok kaliteli gübre de elde edilmektedir (Soysal, 2009).

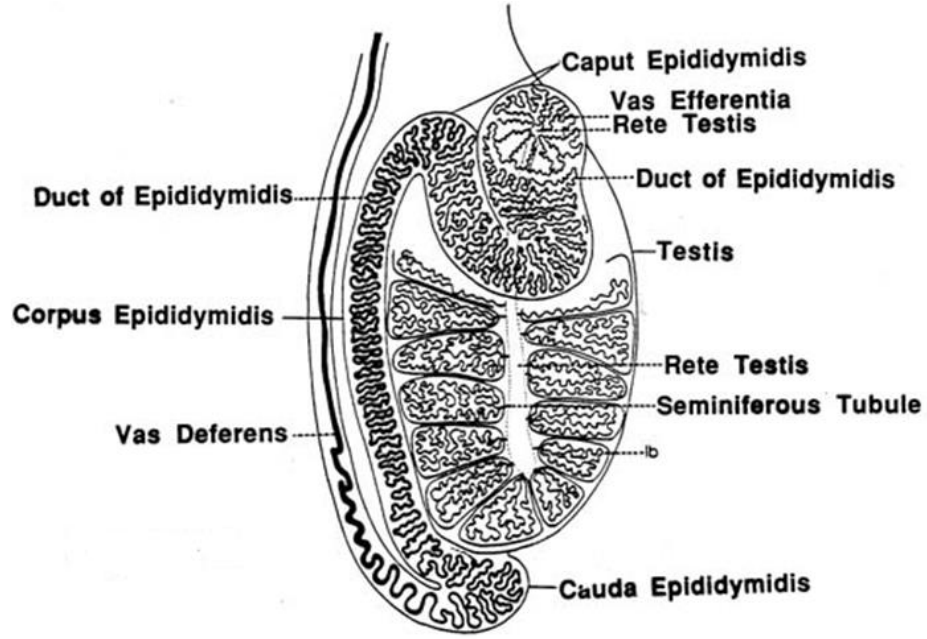
2.3. Mandaların Fizyolojik ve Üreme Özellikleri

Tüm erkek hayvanlarda olduğu gibi mandalarda da üreme organları, spermatozoonların üretilmesi, olgunlaştırılması ve taşınmasından sorumlu olmakla beraber spermatozoonu canlı tutmak ve bir yumurtayı başarılı bir şekilde dölmek için gerekli bileşenleri sağlamaktan sorumludur. Erkek üreme sisteminin anatomisi testisler, seminal plazma üretiminden sorumlu olan aksesuar bezler (bulboüretal bez, vezikula seminalis, prostat, ve ampulla) ve sekonder üreme organları (penis, epididimis, ve vas deferens) olarak üç ana kısma ayrılabilir (Van Leeuwen, 2020).



Şekil 2.2. Erkek Üreme Organları (Van Leeuwen, 2020).

Erkek mandalarda üreme organları genel olarak erkek sığırlara benzerlik gösterir. Erkek mandalarda prepusyumun serbest ucu erkek sığırlara nazaran daha kısa ve daha az kıllıdır. Testisler doğumdan sonraki altıncı ayda scrotal keseye inerler (Aksoy ve Tekeli, 1993). Erkek üreme organları Şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Testislerin temel görevi spermatozoon üretmenin yanı sıra erkek cinsiyet hormonu olan testosteronu üretmektir. Testosteron, seminifer tübüller arasında bulunan leydig hücreleri tarafından üretilir. Testosteronun işlevleri sadece cinsel üreme ile sınırlı değildir, aynı zamanda bir erkek hayvandaki yağ dağılımının düzenlenmesinde, erkeğin genel kas kütlesinin yanı sıra kırmızı kan hücresi üretiminde de rol oynar. Testisler ayrıca spermatogenezde önemli bir rol oynayan sertoli hücrelerini içerir (Griswold, 1998). Bazal kayıtsız destek hücrelerinin sertoli hücrelerine farklılaşmasının 6 ayda (Testis ağırlığı 17 gr) başladığı ve sertoli hücre oluşumunun 12 aylıkken (Testis ağırlığı 75 gr) tamamlandığını gösterilmiş, spermatositler 12 aylıkken görülmeye başlanmış, 18 aylıkken ise spermatidler görülmüştür. Spermatogenezis oluşumu 18 aylıkken (Testis ağırlığı 100 gr üzerindedir) meydana geldiği belirlenmiştir (Ahmad, et al., 2010).



Şekil 2.3. Testisin Yapısı (Van Leeuwen, 2020).

Epididimisler tübüler yapıda olup testislere yapışık halde bulunur. Epididimis kıvrımlı bir yapıda olup caput epididimis, corpus epididimis ve cauda epididimis olmak üzere üç kısma ayrılır. Testisin yapısı Şekil 2.3'te şematize edilmiştir. Testisteki spermatozoon sadece epididimiste olgunlaşma gerçekleştiği zaman döllenme yeteneğini kazanır ve bir yumurtayı dölleme potansiyelini elde eder. Epididimis spermatozoon olgunlaşmasının dışında spermatozoonun testisten vas deferense taşınması spermatozoon konsantrasyonunu artırmak için testis sıvısının emilmesi, spermatozoonun depolanması ve ejaküle olmayan spermatozoonların dejenerasyonu gibi görevleri de vardır (Bertol, 2016; Whittier, 2016).

Mandalar sığırlara göre pubertaya daha geç ulaşırlar. Dişi nehir mandalarında bu süre 15-18 ay iken bataklık mandalarında 21-24 ay olarak bildirilmektedir. Anadolu mandalarında ise bu süre 13-15 ay olarak tespit edilmiştir. Manda boğalarında ise puberta 18-28. aylar arasında olmaktadır. Damızlık olarak kullanılma yaşı ise dişiler için 24-30 ay, erkekler için de ortalama 24 ay olarak bildirilmektedir (Aksoy ve Tekeli, 1993; Küçükkebabçı ve Aslan, 2002). Mandalar, sığırlara nazaran daha ilkel hayvanlardır. Üreme fonksiyonları çevresel faktörlerden etkilenir. Sığırlara kıyasla daha çok koyunlara benzeyen bir dizi fizyolojik özellik ile karakterizedir (Presice, 2007). Dünya genelinde yapılan araştırmalar ergenliğin cins, mevsim,

iklim, beslenme sistemleri ve büyüme oranından önemli ölçüde etkilendiğini göstermektedir (Barile, 2005).

Üreme verimliliği, üretkenliği etkileyen birincil faktördür ve dişi mandalarda pubertaya gelmesinin geç olması, buzağılama mevsimselliği, doğum sonrası uzun anöstrus süreleri ve buzağılama aralığının geniş olması nedeniyle engellenir. Ayrıca, sığırlarda normal bir uygulama olan ve yaygın bir şekilde kullanılan suni tohumlama (ST) uygulaması, dişi mandaların östrus belirtilerinin zayıflığı ve östrusun tespitini çok zorlaştıran östrus süresinin uzunluğunun değişkenliği nedeniyle mandalarda nadiren yapılmaktadır (Barile, 2005).

Mandalarda kızgınlık belirtileri sığırın belirtilerine benzemektedir. Yerinde duramama, sık ve az idrar yapma, vulvanın ödemi ve böğürme en belirgin özelliklerdendir (Aksoy ve Tekin, 1991). Jainudeen, et al., (1981) de yaptıkları çalışmada sığırlarda ejakülasyonu karakterize eden aktif ileri sıçrama hareketinin mandalarda belirgin olmadığını bildirmişlerdir. Mandalara ait bazı reproduktif özellikler Tablo 2.3.'te verilmiştir.

Tablo 2. 3. Perera, et al. 2005'te bildirilen mandalarda reproduktif özellikler (Aktaran Perera, et al., 2008'den uyarlanmıştır.)

Parametre	Ort.	Min.-Maks.
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 (saat)	34	24-48
Gebelik süresi (nehir mandası-gün)	310	300-320
Gebelik süresi (bataklik mandası-gün)	330	320-340
Yavruların doğum ağırlığı (kg)	26	22-36
Uterusun involüsyon süresi (gün)	30	25-35

2.4. Manda Spermasının Genel Özellikleri ve Spermayı Etkileyen Faktörler

Manda sperması alınan manda boğasının ırkı, yaşı, ortamda dişi mandanın bulunması ve mevsime göre değişik özellikler gösterebilmektedir. Manda spermasının yoğunluğuna bağlı olarak vizkozite ve renkte bazı değişiklikler meydana gelebilir. Manda spermasının hacmi sperması alınan boğanın cinsine göre değişmekle beraber genç manda boğalarında 1-3 ml iken yaşlı manda boğalarında 6 ml'ye kadar ulaşabilmektedir (Vale, 1994). Jainudeen, et al., (1981) de yapmış oldukları çalışmada yaşları 2 ila 6 arasındaki mandalardan alınan 182 ejakülatı

incelemiş ve ortalaması 2,9 ml olan (1,9 ve 3,4 arasında değişen) bir değer bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada ejakülatın görünümünü ince ve sulu sıvıdan sütlü bir sıvıya kadar değişen kıvamlarda olduğunu tespit etmiş, elde edilen bu değişimin sperm konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise manda sperması ejakülatı renginin sarımsı, sarımsı beyaz ve beyaz olarak, görünümünün ise sulu, seröz ve sütümsü özellik gösterdiği bildirilmiştir (Castro, et al., 2017).

Manda spermasına ait genel özellikleri gösteren bilgiler Tablo 2.4.'te verilmiştir.

Tablo 2. 4. Manda spermasına ait genel özellikler (Sansone, et al., 2000'den uyarlanmıştır)

Özellikler	Değerler
Renk	Beyaz, sütlü beyaz, çok hafif mavi
Miktar (ml)	3 (2-8)
Motilite (%)	>70
pH	6,7-7,5
Yoğunluk (spermatozoon/ml)	600x10 ⁶ -1200x10 ⁶
Canlı Spermatozoon Oranı (%)	>70
Anormal Spermatozoon Oranı (%)	<70

İbrahim ve ark. 1985 bildirdiğine göre (aktaran Sansone, et al., 2000) manda spermasında ve seminal plazmasındaki bazı fiziksel ve biyokimyasal parametreler Tablo 2.5.'te verilmiştir.

Tablo 2. 5. Manda Spermasında ve seminal plazmasındaki fiziksel ve biyokimyasal parametreler (Sansone, et al., 2000'den uyarlanmıştır)

Özellikler	Sperma	Seminal Plazma
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	31,42±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
Alkalın Fosfataz (U/100ml)	326,05±2,16	331,2±2,6
Çinko (µ mol/l)	14,3	86,88

Manda sperması sığır spermasına göre yüksek miktarda fruktoz, asit ve alkalın fosfataz aktivitesi ve düşük miktarda askorbik asit ihtiva etmektedir. Spermatozoon asit fosfataz konsantrasyonu, motil ve canlı spermatozoon oranı, dehidrogenaz

aktivitesi ve fruktoz kullanım oranı ile doğrudan bir ilişki göstermektedir. Yüksek alkali fosfataz seviyesi motilite yüzdesinin ve canlılığının azalmasıyla kendini göstermektedir (Abdou, et al., 1978).

Manda spermasındaki spermatozoonların soğutma sıcaklığında (+4 °C) antioksidan enzimlerinin faaliyetlerinin daha az olması, daha yüksek lipid peroksidasyonuna sebep olduğunu bildirmiş bu da manda spermatozoonlarının soğutma sıcaklığında (+4 °C) saklandığında sığır spermatozoonlarına kıyasla oksidatif strese daha yatkın olduklarını göstermiştir (Nair, et al., 2006). Spermanın kısa süreli saklanması (+4 °C) dikkat edilmesi gereken unsurlardan biri de spermanın içinde bulunduğu sulandırıcıda meydana gelebilecek pH dalgalanmalarıdır. pH dalgalanmaları spermanın motilite, kapasite durumu ve membran bütünlüğüne olumsuz etkisi olabilir. Bu olumsuzluğa düşük pH'da azalan Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin neden olduğunu düşündüklerini bildirmişlerdir (Zhou, et al., 2015).

Mandalarda fotoperiyodun libido ve cinsel aktiviteyi etkilediği ve hatta sperma kalitesi ve dondurulabilirliğine olumsuz yönde etkileyecek bir faktör olduğu bildirilmiştir (Sansone, et al., 2000). Bununla birlikte yaz aylarında manda spermatozoasının dondurma stresine aşırı hassas olduğunu ve bundan dolayı mümkün olduğunca bahar ve kış aylarında dondurulma işleminin yapılmasının daha iyi sonuçlar vereceğini bildirmişlerdir (Perera, 1999). Benzer bir çalışmada Tuli and Singh, (1983)'te yapmış oldukları çalışmada daha yüksek spermatozoon hareketliliği ve uzun süreli saklama için manda spermalarının dondurulmasının kış mevsiminde olması gerektiğini bildirmişlerdir. Mandada mevsimin fertilizasyona etkisinin araştırıldığı çalışmada, üreme sezonunda ve üreme sezonu dışında alınan spermalarda spermatolojik parametreler incelendiğinde, motilite oranları benzer bulunurken morfolojik anormallikler ve akrozom bozukluklarının üreme mevsimine göre farklı olduğu gözlenmiştir. Üreme mevsiminde morfolojik anormallikler % 14,8 iken üreme mevsimi dışında ise bu oran % 25,2 olarak tespit edilmiştir. Akrozomal hasarlarda üreme mevsiminde % 2,6, üreme mevsimi dışında %15,4 olarak bulunmuştur. Genel olarak üreme mevsiminde alınan spermaların dölleme yeteneklerinin diğer dönemlere kıyasla daha fazla olduğu bildirilmiştir (Heuer, et al., 1987).

Erkek mandaların, benzer vücut ağırlığına sahip olan erkek sığırlarla karşılaştırıldıklarında testis ağırlıkları sığırlarinkine kıyasla yarı yarıya kadardır. Yapılan bir çalışmada mandalarda testis çevresi ve testis parankiminin gramı başına ortalama günlük spermatozoa üretimi 1 yaşından 3-3,5 yaşına kadar hızla artmış daha sonra artan yaş ile birlikte stabil kalmıştır. Sol testis sağ testisten daha ağır ve günlük spermatozoa üretimi daha fazladır. Testis parankiminin gramı başına günlük spermatozoa üretimi arasında sağ ve sol testiste fark yoktur. Mevsim günlük spermatozoa üretimini etkileyen en önemli unsurlardan biridir. Yaşla birlikte muhtemelen artan fibröz doku içeriğinden dolayı spermatozoa üretimi azalmıştır. Beslenme de ergenlik yaşını etkilediğinden, dolaylı olarak spermatozoa üretimini etkileyen unsurlar arasında yer almaktadır (M^cCool and Entwistle, 1989). Aşılama uygulamasının yapılması da mandalarda spermatolojik parametreler üzerine olumsuz bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Bhakat, et al., 2015).

Manda spermasının sulandırılmasına katılan birçok madde, manda spermasının taze, equilibrasyon sonrası ve çözündürme sonrası spermatolojik parametrelerine olumlu ya da olumsuz etki yapmaktadır. Fattouh and Abdou, (1991) yılında yapmış oldukları çalışmalarında hem sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda kafein ilavesinin, hemde çözündürme çözeltisine kafein ilavesinin çözüm sonu motiliteye etkisi araştırılmış ve her iki uygulamada da 2 mM kafein ilave edilmesi diğer oranlara (4 ve 6 mM) kıyasla çözüm sonu motiliteyi önemli derecede arttırmıştır. Benzer bir çalışmada El-Menoufy, et al., (1986)'da sperma sulandırıcısına kafein ilavesinin manda spermasındaki fruktolizisi ve spermatozoon hareketliliğini uyardığını bildirmişlerdir. Qamar, et al., (2013)'te yapmış oldukları çalışmada dondurmadan önce manda boğası spermatozoasına kolesterol loaded cyclodextrin (CLC) teknolojisi kullanılarak kolestrol eklenmesi, donma ve çözündürme sonrasında spermatozoonun akrozomunun canlılığını, hareketliliğini ve bütünlüğünü arttırdığını bildirmişlerdir.

Manda spermasında çözüm sonrası sperma kalitesinin ve gebelik oranının araştırıldığı bir çalışmada erkek mandalardan ejakulasyon sonrası alınan spermalar laboratuvar şartlarında hazırlanan Tris ve ticari bir sulandırıcı olan Optixcell sulandırıcıları ile sulandırılmış ve incelenen sperma numunelerinin hepsinde lipozom içeren Optixcell sulandırıcısı, rutin olarak kullanılan Tris sulandırıcısına kıyasla çözüm sonrası sperma hareketliliği, plazma membran bütünlüğü ve akrozomal

bütünlükte iyileşme gözlemlenmiştir. Elde edilen gebelikler değerlendirildiğinde Optixcell sulandırıcısından ortalama % 59,5 gebelik elde edilirken Tris sulandırıcısından elde edilen gebelik oranı % 41,5 olarak tespit edilmiştir (Ansari, et al., 2016).

Akhter, et al., (2010)'da yaptıkları benzer bir çalışmada laboratuvar ortamında hazırlanan Tris sulandırıcısı ve ticari sulandırıcı olan Bioxcell sulandırıcılarının çözüm sonu sperma kalitesi üzerine etkilerini araştırmış, ticari bir preparat olan Bioxcell'in Tris sulandırıcısına eşit bir verimlilikte manda spermasının dondurularak saklanması kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Yine benzer bir çalışmada yumurta sarısı bazlı sulandırıcılar ile soya fasülyesi bazlı sulandırıcıların dondurma sonrası gebelik oranları araştırılmış yumurta sarısı bazlı sulandırıcılarda gebe kalma oranı % 41,5 iken soya fasülyesi bazlı sulandırıcılarda % 56 oranında tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre yumurta sarısı yerine soya fasülyesi bazlı sulandırıcıların manda sperması dondurulmasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Akhter, et al., 2012).

2.5. Epididimal Manda Spermasının Özellikleri

Mandalarda epididimal sperma kalitesini etkileyen birçok çevresel ve fizyolojik etkenlerin (hayvanın yaşı, mevsim ve beslenme vb.) olmasına rağmen bunların dışında kesilen hayvandan en kısa sürede epididimislerin alınması laboratuvara getirilmesi, hazırlanan sperma sulandırıcısının özellikleri ve uygulanacak dondurma protokolleri de sperma kalitesinde etkili olmaktadır.

Manda spermatozası diğer türlerde (sığır, rat vb.) olduğu gibi motilite için yetenekli olmasına karşın epididimiste pasif halde bulunmaktadır. Bunun sebebi olarak cauda epididimis sıvısında bulunan pH'ya bağımlı etkenlerin sebep olduğu ve eklenti bezlerinin ejakülasyon sırasında salgıladığı salgılarla bu duruma neden olan pH etkenlerinin ortadan kaldırılması sonucu spermatozoanlar aktif hale geldiği bildirilmiştir (Turner and Reich, 1985). Mandalardan elde edilen epididimal spermaya sperma sulandırıcısı eklendikten sonra 2-5 dakika içerisinde motil yeteneği kazandığı saptanmıştır (Acott and Carr, 1984).

Cauda epididimisteki spermatozoon konsantrasyonu, ejakülasyondan önce spermatozoonun atılım yolu boyunca aksesuar bezler tarafından üretilen ek sperma plazmasındaki sıvıları alamadığından çok yoğundur (Herdis, et al., 2008).

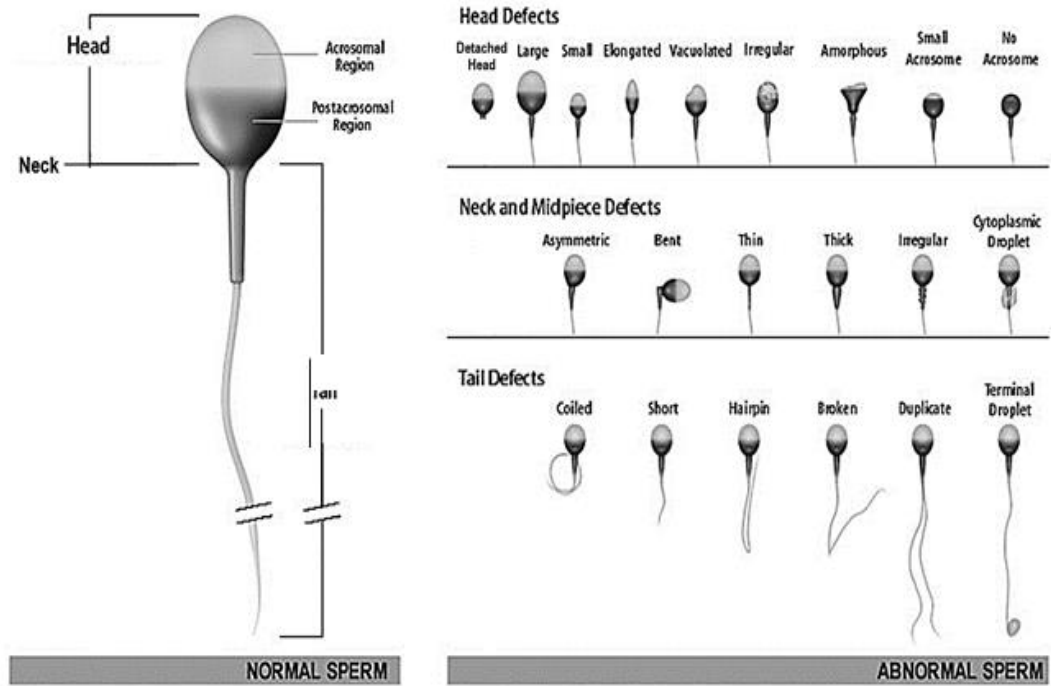
Mandalarda epididimal spermatozoon rezervleri üzerine yapılan çalışmada manda boğası başına toplam epididimal spermatozoa rezervi yaklaşık 36,2 milyar olarak ölçülmüştür. Sağ ve sol testislerin epididimisleri ayrı ölçüldüğü çalışmada epididimisler arasında önemli bir fark bulunmazken, epididimislerdeki spermatozoanın % 66'sı cauda epididimiste % 4'ü corpus epididimiste % 30'u caput epididimiste bulunduğunu bildirmişlerdir (Sharma and Gupta, 1978). Yine benzer yapılan bir çalışmada Avustralya nehir mandalarından alınan testislerden elde edilen epididimal spermaların epididimisteki dağılımı da % 60'ı cauda epididimis % 13'ü corpus epididimis ve % 27'si caput epididimis olarak tespit edilmiştir (M^cColl and Entwistle, 1989).

Yapılan çalışmalarda elde edilen manda epididimal spermalarının kesim sonrası doku dejenerasyonunun zararlı etkilerini en aza indirmek için 30 dakika ila 4 saat arasında laboratuvara ulaştırılmış ve sulandırılmak için hazır hale getirilmiştir (Lambrechts, et al., 1999).

Herold, et al., (2006) yılında yapmış oldukları çalışmada epididimal manda spermasının dondurulmasında ticari preparatardan AndroMed[®] ve Triladyl[™] sulandırıcılarını kullanmış ve taze spermada progresif motilite sonuçlarını sırasıyla % 35 ± 21 ve % 21 ± 9 olarak bulmuşlardır. Yine Herold, et al., (2004a) yaptıkları çalışmada epididimal manda spermalarını AndroMed[®], Triladyl[™] ve Red Ovine Freezing Buffer (IMV, Fransa) sulandırıcıları ile sulandırmış ve taze spermada sırasıyla % 31 ± 21 , % 19 ± 11 ve % 24 ± 15 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise TYS (Tris-yumurta sarısı-glisero) sulandırıcısı (3,028 gr Tris (hydroxy methyl) amino methane, 1,675 gr sitrik asit monohidrat, 1,25 gr früktoz, 500-1000 IU/ml Penicillin G sodium, 500-1000 µg/ml streptomycin sulphate, % 10 yumurta sarısı, % 7 gliserol ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanmış solüsyon) ile epididimal manda spermaları sulandırılmış ve taze spermada % $72,75 \pm 0,91$ oranında progresif motilite tespit etmişlerdir (Hiron, et al., 2006).

Motilite değerlerinin yanı sıra yapılan başka çalışmalarda da akrozomal bütünlük ve ölü-canlı spermatozoa oranları araştırılmış Singh, et al., (2007) yılındaki çalışmalarında dondurma öncesi spermanın muayenesinde akrozomal bütünlüğü % $80,2 \pm 1,08$ ve canlı spermatozoa oranını % $83,6 \pm 0,95$ olarak tespit etmişlerdir. Lambrechts, et al., (1999), 1995 ve 1996 yıllarında yılın tamamını kapsayan çalışmalarında akrozomal bütünlük, anormal spermatozoon ve ölü spermatozoon

oranlarını araştırmış dondurma öncesi (taze) elde ettikleri akrozomal bütünlük sonuçları sırasıyla % $89,3 \pm 2,3$ ve % $93,5 \pm 2,2$ verilerini anormal spermatozoon oranlarını sırasıyla % $31,3 \pm 7,6$ ve $24,7 \pm 6,7$ verilerini elde ederken ölü spermatozoa oranında ise sırasıyla % $9,6 \pm 2$ ve % $15,6 \pm 1,1$ verilerini elde etmişlerdir. Kaydedilen anormal morfolojiler arasında çift başlılar, kopuk başlılar, çift orta parça, bükülmüş orta parça, sitoplazmik damlacıklar, çift kuyruklar ve kıvrımlı kuyruklar gibi anomaliler kayıt edilmiştir (Lambrechts, et al., 1999). Çevresel etkilerden veya genetik faktörlerden kaynaklanabilecek anomaliler baş orta kısım ve kuyruk anomalilerine göre sınıflandırılabilir (Şekil 2.4). Bir numunedeki anomali yüzdesi mevsim, cins, boşalma sıklığı ve stresten etkilenebilir. Yüksek anomali yüzdesi spermanın kullanımı veya kriyoprezervasyonu için değerlendirilmesini etkileyecektir (Van Leeuwen, 2020).



Şekil 2. 4. Normal ve Anormal Spermatozoon Görselleri (Van Leeuwen, 2020).

Kumar, et al., (2008)'deki seminal plazma proteinlerinin spermanın dondurulabilirliği üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarında akrozomal bütünlük ve ölü-canlı spermatozoon oranları da incelenmiş, dondurma öncesi spermanın muayenesinde % $80,33 \pm 0,33$ akrozomal bütünlük tespit edilirken, ölü spermatozoa

oranını da $17,67 \pm 0,33$ olarak bulmuşlardır. Yulnawati, et al., (2010)'daki ejaküle ve epididimal spermanın karşılaştırılmasının yapıldığı çalışmalarında motilite, anormal ve sitoplazmik membran geçirgenliği parametrelerini Tablo 2. 6.'daki gibi bildirmiştir.

Tablo 2. 6. Ejakule ve epididimal sperma arasındaki farklar (Yulnawati, et al., (2010).

Parametreler	Ejakule Sperma (%)	Epididimal Sperma (%)
Motilite	70.0 ± 0.0	65.0 ± 0.0
Anormal spermatozoon	6.5 ± 1.5	15.0 ± 3.0
Sitoplazmik membran geçirgenliği	77.5 ± 1.5	79.0 ± 0.0

2.6. Kriyoprezervasyon ve Etkileri

Kriyoprezervasyon, hücrelere uygulanacak işlemler (sulandırma-soğutma-dondurma-çözdürme) esnasında oluşabilecek ozmotik ve termik şoklara karşı hücrelerin en üst seviyedeki biyolojik uyumunu kapsayan fizyolojik olmayan bir yöntemdir (Holt, 2000). Dondurma-çözdürme işlemleri esnasında oluşabilecek hasarlar genellikle hücre zarı (plazma ve mitokondriyal) etkilerken, hücre çekirdeği de etkilenebilmektedir (Blesbois, 2007). Hücre zarında meydana gelebilecek hasarların, spermatozoa canlılığı ve adenzin trifosfat konsantrasyonu dahil birçok metabolik olay üzerine etkisi vardır (Andrabi, 2009).

Gao, (1997)'ya göre hücre kriyoprezervasyonunda kullanılan başlıca adımlar şu şekilde özetlenebilir:

1. Soğutmadan önce hücrelere kriyoprotektif ajanların eklenmesi,
2. Hücre süspansiyonunun donma noktasında veya birkaç derece altında ve hücrelerin depolandığı düşük bir sıcaklığa soğutmak (kendiliğinden veya yapay olarak aşırı soğutmayı önlemek için hücre süspansiyonundaki buz kristallerini uyarmak)
3. Hücreleri ısıtmak,
4. Numuneyi çözdükten sonra kriyoprotektif ajanları hücrelerden çıkarmak.

Dondurularak saklanan hücrelere verilen zararın, yukarıdaki adımların her biri veya bir kombinasyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir (Gao, 1997).

Spermatozoon vücut dışına çıktıktan sonra düşük sıcaklıklara karşı aşırı duyarlıdır. Dondurulmuş spermatozoonun ilk olarak plazma membranı hasar görür. Çözdürülen spermada su ve iyonların hücre içi ve dışında değişmesine ve spermatozoonların ölümüne neden olur (Bailey, et al., 2003).

Kriyoprezervasyon esnasında hücrelerin meydana gelen zararları ortaya çıkaran durum, düşük sıcaklıkta depolamaya dayanma yetenekleri değildir; daha ziyade, hücrelerin iki kez (Soğutma ve ısıtma) geçmesi gereken bir ara sıcaklık bölgesinin (-15 ila -60 °C) ölümcüllüğüdür (Mazur, 1963).

Hücreler yaklaşık -5 °C' ye kadar soğutulduğunda hem hücreler hem de hücreleri çevreleyen ortam donmamış ve aşırı soğutulmuş olarak kalır. Dış ortamda -5 °C ila yaklaşık -10 °C arasında buz formları (ya kendiliğinden ya da solüsyonun sınıfının bir sonucu olarak) oluşur, ancak hücrelerin içerikleri donmamış ve aşırı soğutulmuş olarak (Muhtemelen plazma zarının buz kristallerinin sitoplazmaya doğru büyümesini engellediğinden) kalır. Hücrelerdeki aşırı soğutulmuş su, kısmen donmuş hücre dışı solüsyondaki sudan daha yüksek bir kimyasal potansiyele sahiptir ve bu nedenle su, ozmotik olarak hücrelerden dışarı akar ve haricen donar. Hücrelerde yaşanan sonraki fiziksel olaylar soğuma hızına bağlıdır (Gao, 1997).

Hücreler çok hızlı soğutulursa, dengeyi sağlamak için su yeterince hızlı kaybolmaz; hücreler giderek daha fazla soğumuş hale gelir ve sonunda hücre içinde donarak dengeye ulaşır. Soğutma yeterince yavaşsa, hücreler aşırı soğutmayı ortadan kaldırmak için hücre içi çözünen maddeleri yeterince yoğunlaştırmak için hızlı su kaybedeceklerdir. Sonuç olarak hücreler susuz kalır ve hücre içi olarak donmaz. Bununla birlikte, hücreler çok yavaş soğutulursa, ciddi bir hacim daralması olacak ve istenilen seviye elde edilmeden önce yüksek çözünen konsantrasyonlara uzun süre maruz kalma yaşayacaklardır ve her ikisi de hücre hasarına neden olabilir (Mazur, 1963).

Lovelock, (1957), artan çözelti konsantrasyonunun ve hücre dehidrasyonunun, hücre zarlarının lipid-protein kompleksleri üzerinde zararlı etkileri olduğunu, onları zayıflattığını ve lipid ve fosfolipid kayıplarını artırdığını buna bağlı olarak ta hücrenin, sonunda parçalanarak katyonlara ve şişmelere geçirgen hale getirildiğini öne sürmüştür.

Sıcaklıktaki aşırı düşüğe bağlı olarak, hücre içi suyun donma riski ve buna bağlı olarak buz kristallerinin oluşumunun mekanik stresinden hücresel yapıların bozulması, kritik değer olan -10 °C'ye ulaştığında ortaya çıkabilir. Şiddetli dehidrasyon, makromoleküllerin denatürasyonuna ve hücrenin aşırı küçülmesine ve geri dönüşü olmayan membran yıkımına kadar neden olduğu çözelti etkisi hasarına

yol açabilir. Diğer bir zarar verici etki, hücrenin her yerinde buz oluşumunun mekanik stresidir (Gao, 1997).

Soğutma esnasında ortaya çıkacak en önemli hasar da soğuk şoku hasarıdır. Soğuk şokunun zararlı etkisi kolesterol/fosfolipid oranı, lipid içeriği, hidrokarbon zinciri doygunluk derecesi ve protein/fosfolipid oranı gibi membran içeriklerinin bileşimine bağlıdır (Parks, 1997). Bununla birlikte oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile de bağlantılıdır (Chatterjee, et al., 2001). Rajoriya, et al., (2016) yılında yapmış oldukları manda spermasının membran kolesterolünün zenginleştirilmesinin, çözüm sonu sperma kalitesine etkisinin araştırıldığı çalışmalarında kriyoprezervasyonun aşamalarında membran kolesterolündeki artışla ilişkili olarak plazma membran bütünlüğünde önemli bir artışın görüldüğünü bildirmişlerdir.

Sperma sulandırıcısı olarak kullanılan yumurta sarısı ve sütün spermayı nasıl koruyabildiğine dair bilgiler tam olmamakla birlikte, yumurta sarısının koruyucu etkisini fosfolipidler ve düşük yoğunluklu lipoprotein bileşenleri içermesinden kaynaklandığı buna karşın sütünde protein fraksiyonu ile koruyucu mekanizmaya katkı sağladığı düşünülmektedir. Fosfolipidlerin spermatozoonun maruz kaldığı soğutma hasarını membran bileşimi ve/veya fiziksel özelliklerini kaybettirmeden azaltabilmektedir (Parks, 1997).

Dondurma ve çözündürme esnasında oluşan ozmotik dengeleme, hücreler için hareketli akışkan geçirgenliği ile tanımlanır. Memeli türlerinde spermanın dondurulabilmesi için kullanılan kriyoprotektanların başarısı hücreye hızlı penetrasyon sağlayabilmesi, düşük aktivasyon enerjisine ve düşük hücrel toksisiteye sahip olması gibi önemli faktörlere bağlıdır (Büyükleblebici, 2012).

Kriyoprotektan ajanların kullanımı, hücre içi buz oluşumunu önlemek ve çözelti etkisini kısıtlamak için çok önemlidir. Sperma için en çok kullanılan kriyoprotektan ajan ise gliseroldür. Geçirgen olmayan kriyoprotektan ajanlara benzer şekilde, gliserol, hücre dehidrasyonunun ozmotik uyarımı yoluyla hücre dışı bir etki uygular, böylece donma için mevcut hücre içi su hacmini azaltır. Gliserolün hücre zarına nüfuz etme kabiliyeti yoluyla ortaya çıkan hücre içi bir etkisi, dehidrasyonun hücre içi ozmotik stres etkisini azaltmasıdır. Bu, hücrel hacmin korunması, iyonlar ve makromoleküllerle etkileşim için gerekli hücre içi suyu değiştirerek ve suyun

donma noktasını düşürerek gerçekleşir. Kullanılan konsantrasyona bağlı olarak nüfuz eden kriyoprotektan ajanlar toksiktir ve membran hasarına neden olabilir ve spermatozoon hareketliliğini azaltabilir. En uygun donma hızlarının yanı sıra kullanılan kriyoprotektan ajan türleri ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için önemli hücresel özellikler, yüzey/hacim oranı, suya karşı membran geçirgenliği ve kriyoprotektan ajan (ve karşılık gelen aktivasyon sıcaklıkları) ve membranın fiziksel strese olan eğilimidir. Farklı türlerden spermatozoa, hücre şekli, hücre hacmi, organel boyutu ve kompozisyonundaki kalıtsal özellikler nedeniyle başarılı kriyoprezervasyon için farklı protokoller gerektirir (Medeiros, et al., 2002).

Spermalara yapılacak işlemlerden soğutma ve dondurma-çözdürme işlemleri esnasında spermatozoon membranı üzerinde fiziksel ve kimyasal strese bağlı reaksiyonlar spermatozoon canlılığını ve fertilizasyon yeteneğinin azalmasına neden olmaktadır (Chatterjee, et al., 2001). Yapılan işlemler sonucunda spermatozoon hücresinin vermesi muhtemel cevaplar Tablo 2.7.'de verilmiştir (Morris and Clarke, 1987).

Tablo 2. 7. Hücrenin dondurulup-çözdürülmesi esnasında meydana gelen hasarların kaynakları (Morris and Clarke, 1987'den uyarlanmıştır.)

Hücrede Oluşan Durum	Hücrenin Vereceği Olası Yanıt
Sıcaklık azalması	Membran lipit faz değişiklikleri ve hücre iskeletinin depolimerizasyonu
Çözünen madde artışı	Ozmotik büzüşme
İyonik madde artışı	Membran üzerine direk etki ve 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

2.7. Manda Spermasının Dondurulma Adımları

Manda spermasının laboratuvara getirildikten sonra dondurulma protokolleri aşağıdaki gibi meydana gelmektedir (Sansone, et al., 2000).

- Son konsantrasyonun $120-150 \times 10^6$ olacak şekilde uygun sulandırıcı kullanılarak tek ya da iki adımda spermanın sulandırılması
- $+5^\circ\text{C}$ deki spermanın $0,2-0,4^\circ\text{C} / \text{dk}$ 'lık bir hızda soğutulması
- Payet içinde paketlenmesi

- Tek adımda yapılan sulandırmada 2 saat, iki adımda yapılan sulandırmada 4-6 saatlik equilibrasyona tabi tutulması
- Programlı soğutma makinası varsa onda, yoksa payetler sıvı azotun 4 cm üzerinde sıvı azot buharında 10-20 dakikada dondurulması

Sansone, et al., (2000)'de manda spermasının dondurulabilme kapasitesinin zayıf olduğunu, bu zayıflığın spermatozoa membranında ki düşük fosfolipit içeriği ve dondurma-çözdürme işlemleri esnasında bu yapının kaybı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Dondurma işleminden önce spermatozoonların sulandırma oranları da dondurma işlemi için kritik aşamalardan biridir ve türden türe ve sulandırıcılara göre değişiklik göstermektedir. Andrabi, (2009) manda sperması sulandırma oranlarını 1:1'den 1:12'ye varan oranlarda başarıyla kullanmıştır.

Dondurma ve çözdürme işlemleri esnasında ortaya çıkan ani sıcaklık değişikliklerine karşı spermatozoonları koruyan kriyoprotektif maddeler; hücre içine giren ya da hücre dışından etki gösterenler olarak iki sınıfa ayrılır. Bu alanda bilinen ve hücre içi etki gösteren en önemli madde gliseroldür. Donma anında en önemli olay kristalleşmedir. Bunun neticesinde hücre membranında yırtılmalar, pH değişiklikleri ve dehidrasyon ortaya çıkar. Giserolün hücre içerisine girmek suretiyle hücre içindeki suyun kısmen dışarı çıkmasını sağlayarak solüsyonun donma noktasını düşürdüğü ve dondurma işlemi sırasında geniş buz kristallerinin şekillenmesine engel olduğu tespit edilmiştir. Sulandırıcının içerisindeki diğer maddelerin oranına bağlı olarak değişmekle birlikte yaygın olarak % 3 ile % 10 arasında değişen oranlarda sperma sulandırıcısına gliserol ilavesi yapılabilmektedir. Spermaya gliserol ilavesini takiben dondurma işlemine geçilmeden önce spermatozoon membranının her iki tarafında gliserolün dengeye ulaşması için + 5 °C de belli bir süre beklenmesinde equilibrasyon süresi denmektedir. Equibrasyon yalnızca gliserol konsantrasyon dengesi olmayıp, gliserolle beraber diğer ozmotik aktif sulandırıcı bilşenlerini de içerdiği göz ardı edilmemelidir (Salamon and Maxwell, 2000). Yapılan bir çalışmalarda 2-9 saat arasında değişen zamanlarda equilibrasyona bırakılmış denemelerde çözüm sonu sperma kalitesi üzerine bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir (Herold, et al., 2004b; Herold, et al., 2006). Equibrasyon sürelerinin araştırılmasının yapıldığı bir başka çalışmada ise farklı equilibrasyon süreleri üzerine çalışılmış 2 saatlik equilibrasyon süresi dondurma sonrası

parametreleri olumsuz manada etkilemiş, daha fazla equilibasyon süreleri (4-8-16) arasında çok fark olmasa da en iyi sonucun 4 saatlik equilibasyon süresi olduğunu bildirmişlerdir (Shahverdi, et al., 2014).

2.8. Epididimal Manda Spermasının Sulandırılması ve Dondurulması

Sulandırıcılar sperma numunelerini seyreltmek, depolamak ve kriyoprezervasyon protokollerinde kullanmak amacıyla kullanılırlar. Sulandırıcılar spermatozoayı beslemek için besin açısından zengin ve spermatozoonun yaşaması için optimum ortamı sağlamalıdır. Epididimal manda spermasının sulandırılarak dondurulmasında sitrik asit bazlı, sitrat bazlı ve tris bazlı hazırlanabilen sulandırıcıların yanı sıra ticari satışı olan sulandırıcı preparatlarda kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda sulandırıcıların ve donmanın sperma kalitesi üzerine etkisini motilite, anormal spermatozoa oranı, ölü spermatozoa oranı ve spermanın membran bütünlüğü gibi spermatolojik parametreler incelenerek araştırılmıştır.

Besin açısından zengin olan Ham's F10 spermatozoonun kısa süreli saklanması için kullanılan sulandırıcılara bir örnek olarak gösterilmiştir (Lambrechts, et al., 1999).

Manda spermasının dondurulması için laboratuvar ortamında yapılan sitratlı-sitrik asit bazlı ve tris bazlı sulandırıcıların yanı sıra ticari olarak satılan sulandırıcılarda kullanılmaya başlanılmıştır. Chinnaiya and Ganguli, (1980)'de akrozomal hasarın araştırıldığı çalışmalarında Tris yumurta sarısı gliserol (TRIS) içeren sulandırıcının yumurta sarısı sitrat (EYC) veya peynir altı suyu sitrik asit (CAW) içeren sulandırıcılara nazaran çözüm sonu motilite oranlarının daha iyi olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapılan başka bir çalışmada ise Tris yumurta sarısı % 7 gliserol (TY-G) sulandırıcısı ile Sitrik asit peynir altı suyu % 7 gliserol (CAW-G) içeren sulandırıcılar farklı equilibasyon sürelerinde dondurulmuştur. Equilibasyon sürelerinden bağımsız olarak TY-G sulandırıcılarına kıyasla CAW-G sulandırıcısında daha yüksek bir hareketlilik kaybı gözlemlenmiştir. Bu kaybın muhtemelen olgunlaşmamış zayıf ve yaşlı spermaların ölümünden kaynaklı olabileceğini düşünmüşlerdir. Yapılan çalışmada 4 saatlik equilibasyon süresinin TY-G sulandırıcısının manda spermasının derin dondurulması için başarı ile kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Tuli, et al., 1981).

Waheed, et al., (2012) yılında sulandırıcıya konulan tavuk yumurta sarısı (TYS) yerine belli oranlarda ördek yumurta sarısı (ÖYS) katmış ve sperma kalitesinin etkilenmesini araştırmışlardır. % 20 tavuk yumurta sarısı yerine değişik oranlarda (% 5, %10, %15 ve % 20) ördek yumurta sarısı ile laboratuvarında tris-sitrik asit-fruktoz ve gliserolle hazırladıkları sulandırıcıları karşılaştırmıştır. Suni vajenle alınan ve % 60 ve üzeri motilite değerlerine sahip spermaları değerlendirmeye aldıkları çalışma sonucu ortalama motilite $69,3 \pm 0,43$, ortalama plazma membran bütünlüğü $84,82 \pm 0,25$, ortalama baş-orta-kuyruk anomalileri oranı sırasıyla $8,28 \pm 0,19$, $1,65 \pm 0,05$, $11,73 \pm 0,23$ olarak tespit edilmiştir. Spermaların dondurma çözündürme sonrası motilitesi $48,83 \pm 0,45$ olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda sulandırıcıdaki % 20 YYS, % 20 ÖYS ile değiştirildiğinde manda sperması kalitesini arttırdığı buna rağmen daha az oranlarda sulandırıcıya katılan ÖYS oranlarının sperma kalitesini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise Kadirvel, et al., (2009) yılında suni vajenle elde edilen % 70 üzeri motil sperma örneklerini değerlendirmeye aldıkları Tris, sitrik asit, früktoz, yumurta sarısı ve gliserol içeren sulandırıcı kullandıkları çalışmalarında çözüm sonu sperma motilitesini taze spermanın motilitesinden % 28 oranında daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir.

Tris (Tris, sitrik asit, yumurta sarısı ve gliserol içeren laboratuvarında hazırlanan sulandırıcı) sulandırıcısını ticari bir sulandırıcı olan Bioxcell ile karşılaştırmalı olarak ve % 80 üzeri motil spermaların değerlendirildiği bir çalışmada dondurma sonrası çözüm motilite oranları sırasıyla $39,16 \pm 1,10$ ve $47,20 \pm 1,63$ olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada çözüm sonrası akrozomal bütünlük-hipoozmotik şişme testi-canlı spermatozoa oranları Tris-sitrat-yumurta sarısı kullanılan sulandırıcı için sırasıyla % 19,28- % 42,92- % 55,08 bulunurken Bioxcell sulandırıcısı için sırasıyla % 21,96 -% 45,96 -% 61,88 olarak tespit edilmiştir (Asr, et al., 2011).

Başka bir çalışmada farklı kanatlı türlerine ait yumurta (ticari tavuk yumurtası, ördek yumurtası, Gine hindi yumurtası, Hint Yerli tavuk yumurtası) sarılarının aynı oranlarda (%20), Tris (tris-sitrik asit-fruktoz ve gliserol) sulandırıcısına katılmasıyla hazırlanan sulandırıcıların sperma kalitesine etkisi araştırılmıştır. Hazırlanan sulandırıcılardan ördek yumurta sarısı ilaveli sulandırıcının diğer tavuk türlerine oranla dondurulmuş çözdürülmüş manda spermasının kalitesini daha iyi oranda koruduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada ördek yumurta sarısı katılmış sperma

sulandırıcısının manda spermatozoonunun kuyruk anormali oranlarına bakıldığında önemli derecede diğer türlerden düşük olduğu tespit edilmiştir (Andrabi, et al., 2008). Kumar, et al., (2016) yılında yapmış oldukları çalışmada sperma sulandırıcısına katılan yumurta sarısı (% 10) yerine sulandırıcıya üç farklı oranda (% 2, % 4, % 6) yumurta sarısı tozu ilavesi yapmış ve sulandırıcıya % 4 düzeyinde yumurta sarısı tozu ilavesinin (% 10) taze yumurta sarısı ve diğer seviyelerdeki (% 2, % 4) yumurta tozu ilavesine oranla çözündürme sonrası sperma kalitesi açısından önemli ölçüde daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Sulandırıcıya katılan % 4 oranındaki yumurta sarısı tozu ilavesinin, manda spermasının dondurularak saklanması için alternatif olabileceğini belirtmişlerdir.

Sperma dondurulması için hazırlanan sulandırıcılar genellikle ejakülatan elde edilen seminal plazma içeren spermanın dondurulması amacıyla kullanılmış ve buna göre tasarlanmıştır. Epididimal sperma seminal plazma içermediğinden direk sulandırıcı ile muamele görür ve bu da motilite üzerine negatif etki edebilir. Bu durumda sadece birkaç damla sulandırıcı ile muamele edip sonra seminal plazma eklenmelidir. Bu işlemten sonra epididimal sperma sulandırıcı ile seyreltilmelidir (Herold, et al., 2004a).

Yapılan bir çalışmada Herold, et al., (2004b) yumurta sarısı içeren ve içermeyen sulandırıcıları karşılaştırmış yumurta sarısı içeren sulandırıcının yumurta sarısı içermeyen sulandırıcıya göre çözüm sonu progresif motilite oranların daha yüksek değerlerde olduğunu ortaya koymuştur.

Sulandırma işlemi ve dondurma işlemleri sırasında spermatozoa, fiziksel veya kimyasal stres nedeniyle membran hasarına maruz kalabilir, bu da spermatozoonların genel kalitesini düşürür ve böylece bir spermatozoonun fertilizasyon yeteneğinde azalma meydana gelir (Andrabi, 2009; Shah, et al., 2016). Sulandırıcıya kriyoprotektan eklenmesinin amacı, dondurulmuş sperma çözöldükten sonra spermanın canlılığını ve fertilizasyon yeteneğini arttırmaktır. Sperma sulandırıcısına katılan maddeler, soğuk şokuna karşı korumaya yardımcı ve besleyici rollere sahiptir. Depolama ve dondurarak saklama sırasında spermanın canlılığının daha iyi korumasının sağlanması amacıyla şekerler, antioksidanlar ve mineraller gibi bileşenlerin eklenmesi gerekmektedir (Van Leeuwen, 2020).

Dondurma ve çözündürme işlemlerinde ısı farklılıklarının araştırıldığı bir çalışmada spermatozoanın sıfırın altında olan bir sıcaklığa konmadan önce yüksek soğutma hızı uygulandığı takdirde motilitesinin daha yüksek olacağı tespit edilmiştir. Çözündürme işlemine de hızlı çözündürmenin (37 °C’de 15 sn) yavaş çözündürmeye (27-30 °C’de 1dk) göre daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Sukhato, et al., 2001).

Tris-yumurta sarısı-gliserol ile hazırlanan sulandırıcı ile sulandırılan epididimal manda spermasından elde edilen dondurma öncesi ve dondurulmuş-çözündürülmüş spermanın muayene sonuçları Tablo 2.8.’de verilmiştir (Hiron, et al., 2006).

Tablo 2. 8. Hiron ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma sonuçları

	Dondurma öncesi	Dondurma sonrası
Progresif motilite	% 72,75	% 51,58
Canlı spermatozoa	% 83,92	% 68,67
Akrozom bütünlüğü	% 80,42	% 66,83
HOST	% 72	% 59,67

Başka bir çalışmada iki ticari sulandırıcı olan Triladyl ve Andromed sulandırıcıları ile yapılan çalışmada taze ve çözüm sonu elde edilen motilite ve progresif motilite oranları karşılaştırılmıştır. Triladyl sulandırıcısı için taze spermada motilite ve progresif motilite oranları % 61 ± 15 ve % 21 ± 9 iken çözüm sonu oranları sırasıyla % 53 ± 12 ve % 17 ± 11 olarak bulunmuştur. Andromed sulandırıcısı için taze spermada % 58 ± 17 ve % 35 ± 21 iken çözüm sonu spermada bu oran % 46 ± 14 ve % 14 ± 13 olarak kayıt edilmiştir (Herold, et al., 2006). Bu çalışmayla paralel olarak aynı ticari sulandırıcılara % 10’luk sığır seminal plazması katılarak elde edilen sulandırıcıların karşılaştırmalı olarak manda epididimal spermasının dondurulmasının değerlerndirildiği çalışmanın sonuçları Tablo 2.9.’da gösterilmiştir (Herold, et al, 2004a).

Tablo 2. 9. Herold, et al, (2004a) yapmış oldukları çalışma sonuçları

	Sulandırılmış Sperma		Çözüm Sonu Sperma	
	Motilite (%)	P. Motilte (%)	Motilite (%)	P. Motilite (%)
Triladyl	48,1±16,39	21,6±12,77	56,4±16,15	21,7±16,72
Triladyl+%10 SSP	36±16,68	14±10,47	45,9±18,53	13,4±1,71
Andromed	53±12,51	32,3±19,01	44,1±21,94	16,7±9,48
Andromed+%10 SSP	28±17,57	12,5±9,02	47,8±20,11	17,2±14,62

Yapılan çalışmalarda dondurma sonrası akrozomal bütünlük ve ölü spermatozoa verileri bildirilmiştir. Kumar, et al., (2008) yılında yaptıkları çalışmada % 64,58 ± 0,99 oranında akrozom bütünlük ile % 35,83 ± 0,41 ölü spermatozoa oranı

bildirilmiştir. Ticari sulandırıcıların karşılaştırıldığı başka bir çalışmada da Triladyl sulandırıcısı ile sulandırılan spermada çözüm sonu akrozomal bütünlük % 56 ± 6 Andromed sulandırıcısı ile sulandırılan spermada çözüm sonu akrozomal bütünlük % 54 ± 6 olarak bildirilmiştir (Herold, et al., 2006). Dondurulmuş Çözdürülmüş epididimal manda spermasının sperma kalitesi ve suni tohumlama başarısının oranlarının araştırıldığı çalışmada sulandırıcı olarak soya fasulyesi bazlı sulandırıcı ve % 20 oranında yumurta sarısı bulunan Tris ve Sitrat esaslı sulandırıcılar kullanılmıştır. Hem soya fasulyesi bazlı hemde yumurta sarısı bazlı sulandırıcıların çözdürme sonrası epididimal sperma kalitesini koruyabildiği ve benzer gebelik oranı sağladığını bildirmişlerdir (Yulnawati, et al., 2013). Çalışmanın çözüm sonu parametreleri Tablo 2.10.'da verilmiştir.

Tablo 2.10. Çözüm sonu Spermatolojik parametreler (Yulnawati et al., 2013)

	Progresif Motilite (%)	Plazma membran geçirgenliği (%)	Gebelik ve doğum Oranı (%)
Soya bazlı	45,00 $\pm$ 4,08	65,82 $\pm$ 1,98	37,5
Tris + YS	40,00 $\pm$ 2,89	65,43 $\pm$ 4,16	40
Sitrat + YS	39,17 $\pm$ 5,34	63,03 $\pm$ 3,61	

Camargos et al., (2013b) yılında spermatozoon hareketliliğini uyarması ile bilinen Sperm TALP Medyum ve Fert TALP Medyumlarının epididimal manda spermasının hareketliliğine etkisi üzerine yapmış oldukları çalışmada spermaya medyumları eklemiş 15 dakikalık inkubasyondan sonra santrifüje ederek spermaları ayırmış ve dondurma öncesinde Tris sulandırıcısı ile sulandırarak dondurmışlardır. Spermatolojik parametrelerden progresif motilite kontrol grubunda % 7,3 iken Sperm TALP Medyum ile inkube edilmiş spermada % 24,87 Fert TALP Medyum ile inkube edilmiş spermada da % 29,7 olarak tespit etmişlerdir. Plazma membran geçirgenliği sonuçlarını da kontrol grubunda % 11,47 iken Sperm ve Fert TALP Medyumunda inkube olanlarda sırasıyla % 36,23 ve % 39,67 olarak bildirmişlerdir. Sonuç olarak spermanın hem Sperm TALP Medyum hemde Fert TALP Medyum ile inkube edilmiş olması spermaların çözüm sonu sperma kalitesini önemli ölçüde arttırmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Üniversiteye yakın mezbahanelere getirilen sağlıklı ve gelişimini tamamlamış 3 yaş ve üzerinde olan yaklaşık 200'e yakın hayvan incelendi. Kesim öncesi muayenesi Resmi Veteriner Hekim'ler tarafından yapılan ve kesimine onay verilen 15 adet sağlıklı Anadolu Mandalarından alınan testisler çalışmanın materyal bölümünü oluşturdu (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Anadolu Mandası

3.2. Testislerin Alınması

Kesim için mezbahaya gelen mandaların testisleri Lambrechts, et al., (1999)'da belirtildiği gibi, kesimin hemen ardından scrotumları bir bıçak ile kesilerek açığa çıkarılmasından sonra spermatik kord'tan epididimislerle beraber kesilerek uzaklaştırıldı (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Testislerin Elde Edilmesi

3.3. Testislerin Laboratuvara Getirilmesi

Epididimisler soğutulmanın hızlanması amacıyla testislerden kesilerek uzaklaştırıldı. Daha öncesinden + 4 °C'yi sağlayacak şekilde buz kalıpları ile soğutulan kapalı bir termosu epididimisler konularak vakit geçirilmeden en kısa sürede (en geç 30 dk) laboratuvara getirildi. Laboratuvara getirilen epididimisler buzdolabında işlenmek üzere bekletildi. Laboratuvardaki epididimislerin en geç 4 saat içerisinde iş ve işlemleri tamamlandı (Lambrechts, et al., 1999). Şekil 3.3.'te epididimislerin laboratuvara getirilmesinin resimleri yer almaktadır.



Şekil 3.3. Epididimislerin Laboratuvara Getirilmesi

3.4. Spermanın Elde Edilmesi

Testislerden ayrılmış olan epididimisler steril bir bistüri yardımıyla cauda epididimis üzerine kesitler atılarak ductus epididimiste bulunan spermanın dışarı çıkması sağlandı. Dışarı çıkan sperma steril bir enjektör yardımıyla çekilerek elde edildi (Patrizio, et al., 1988) (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Spermanın Elde Edilmesi

3.5. Spermanın Sulandırılması

Çalışmada farklı sulandırıcıların (Şekil 3.5.) kullanılacağı 6 deneme grubu oluşturuldu. Elde edilen spermalar 6 ayrı sulandırma solüsyonu için eşit miktarda bölüştürülerek çalışmanın grupları oluşturuldu. Deneme gruplarında spermalar;

1. Deneme grubu TRİS (3,028 gr Tris, 1,675 gr sitrik asit, 1,25 gr früktoz, %7 gliserol ve %20 yumurta sarısı) sulandırıcısı ile;
2. Deneme grubu ticari bir preparat olan OptixCell® (sentezlenmiş lipozomlara dayanan hayvansal protein içermeyen) sulandırıcısı ile,
3. Deneme grubu ticari bir preparat olan Bioxcell® (Bitkisel protein bazlı hayvansal protein içermeyen) sulandırıcısı ile,
4. Deneme grubu ticari bir preparat olan BullXcell® (Yumurta sarısı eklenmesi için özel hazırlanmış özel preparat) sulandırıcısı ile,
5. Deneme grubu ticari bir preparat olan AndroMed® (Fosfolipidler, TRIS, sitrik asit, şeker, antioksidan, tampon, gliserol ve saf su içeren hayvansal kökenli içerik içermeyen) sulandırıcısı ile,
6. Deneme grubu ticari bir preparat olan Steridly® (TRIS, sitrik asit, şeker, tampon, gliserol, saf su ve ışınlanmış steril yumurta sarısı içeren) sulandırıcısı ile sulandırıldı.



Şekil 3.5. Çalışmada Kullanılan Ticari Sulandırıcılar

3.6. Sulandırılan Spermaların Equilibasyonu ve Dondurma-Çözdürmesi

Sulandırılan epididimal spermalar son konsantrasyonları $80-100 \times 10^6$ sp/ml olacak şekilde ayarlandıktan sonra manuel olarak 0,25 ml'lik payetlere çekildi. Ardından payetler içerisindeki spermalar $+4^\circ\text{C}$ 'de 4 saat equilibasyona tabi tutulduktan sonra sıvı azotun 6 cm üstünde tutularak sıvı azot buharında (-80°C ila -120°C 'de) 20 dk. bekletilerek donduruldu (Sansone, et al., 2000). Son olarak -196°C 'deki sıvı azot içerisinde daldırılıp, çözündürme işlemine kadar sıvı azot tankı içerisinde saklandı. Dondurululan payetler incelenmek üzere sıvı azot tankından alınarak 37°C 'ye ayarlanmış su banyosunda 30 saniye süreyle tutularak çözündürüldü ve ardından payetlerden çıkarılan spermalar, spermatolojik parametreler yönünden incelendi. (Dudeja, 1990)

3.7. Çalışma Grupları Spermatolojik Muayeneleri (Taze, Equilibasyon sonrası ve Çözdürme sonrası)

Elde edilen spermalar spermatolojik parametreler yönünden taze, equilibasyon sonrası ve dondurma-çözdürme sonrası zamanlarda incelendi. Spermatolojik parametrelerden spermatozoa motilitesi (%), spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^6$ sp/ml), ölü/canlı spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (%) Tekin, (1994)'e göre, Hipo-ozmotik şişme testi (HOST) oranı da (Sarıözkan ve ark., 2015) yöntemlerine göre tespit edildi.

3.7.1. Motilite Muayenesi (%)

Motilite muayenesi ısıtma tablalı, faz-kontrast mikroskop kullanılarak yapıldı ve oranı yüzde (%) olarak belirlendi. Sulandırılan spermadan küçük bir damla alınarak ısıtma tablalı ve ısısı 37°C 'ye ayarlanmış mikroskopta lam üzerine konulup, lamel ile kapatılarak $40\times$ büyütmede spermatozoonların hareketlerinin incelenmesi yapıldı. 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 tespit edildi (Tekin, 1994).

3.7.2. Ölü/Canlı Spermatozoa Oranı (%)

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

boyası kullanıldı. Sulandırılan sperma, iki damla Eosin ile karıştırılıp bir lam üzerine froti çekildi ve 15 saniye boyunca kurumaya bırakılan slaytlar mikroskopta 40× büyütme ile 400 tane spermatozoon sayılarak, kırmızı renk boya alan (ölü hücrelerin) spermatozoonların sayısı yüzde (%) olarak belirlendi (Tekin, 1994).

3.7.3. Anormal Spermatozoa Oranı (%)

Anormal spermatozoon oranının belirlenmesinde sıvı fikzasyon yöntemi kullanıldı. Baş-akrozom, orta kısım, kuyruk anomalileri ve toplam spermatozoa anomalileri oranı yüzde (%) olarak belirlendi. Sulandırılan sperma, Hancock solüsyonu içerisinde fikse edildi ve hazırlanan bu solüsyondan bir damla lam üzerine konulup üzeri lamel ile kapatıldı. Kapatılan lamel üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılarak 100× büyütmede dört yüz spermatozoon sayılarak morfolojileri yüzde olarak tespit edildi (Tekin, 1994).

3.7.4. Hipo-Ozmotik Şişme Testi (HOST) Oranı (%)

Hipo-ozmotik şişme testi (HOST), sarmal ve şişmiş kuyruklara dayalı olarak spermatozoon zarının işlevsel bütünlüğünü değerlendirmek için kullanıldı. Spermatozoon membranının fonksiyonel bütünlüğünü belirlemek için 100 mOsm/lt'lik bir solüsyon (9 gr fruktoz ile 4,9 gr sodyum sitratın 1 litre distile su içerisinde çözündürülmesi ile hazırlanan) kullanıldı. 30 µl sperma örneği 300 µl'lik 100 mOsm hipo-ozmotik solüsyonu içerisinde 37 °C'de 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra, bu karışımdan alınan 0,2 ml'lik örnek ısıtma tablalı mikroskopta 100× büyütmede iki yüz spermatozoon sayılarak değerlendirildi. Şişmiş veya kıvrılmış kuyruklu spermatozoonlar kaydedildi (Sarıözkan ve ark., 2015).

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada, epididimal manda spermalarını sulandırmasında kullanılan Andromed[®], Bioxcell[®], Bullxcell[®], Optixcell[®], Steridly[®] ve Tris (Tris- yumurta sarısı-sitrik asit- fruktoz- gliserol) sulandırıcılarının epididimal manda spermalarında farklı zamanlardaki (Taze, equilibrasyon sonrası ve dondurma çözündürme sonrası) progresif motilite oranı, ölü spermatozoon oranı, anormal spermatozoon (baş, orta kısım, kuyruk ve toplam) oranı ve hipo-osmotik şişme testi (HOST) oranlarının etkilerini ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilmesi için GENMOD (Genelleştirilmiş

Doğrusal Modeller) istatistik yönteminde logaritmik bağlantı fonksiyonun entegrasyonu ile analiz edilmiştir. Ayrıca tüm değişkenlerin ortalama, ortalamanın standart sapması, minimum ve maksimum değerler hesaplanarak tanıtıcı istatistikler şeklinde özetlenmiştir. Çalışmada yapılan tüm istatistik hesaplamalar ve istatistik analizlerde SAS (2009) istatistik paket programından yararlanılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Mezbananede kesilen erkek Anadolu mandalarının sağlıklı 15 tanesinden kesim sonrası elde edilen epididimal spermalar spermatolojik muayenelerden spermatozoa progresif motilitesi (%), ölü/canlı spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (%) ve Hipo-osmotik şişme testi (HOST) oranı (%) yönünden taze, equilibrasyon sonrası ve çözündürme sonrası olmak üzere 3 aşamada değerlendirildi.

Spermatolojik parametrelerden progresif motilite bulgularını karşılaştırdığımızda taze spermada Andromed® ve Bioxcell® sulandırıcılarının diğer sulandırıcılara göre önemli derece kötü sonuçlar verdiği belirlendi ($P<.0001$). Çözündürme sonrasında alınan bulgularda ise Optixcell® ve Tris sulandırıcıları ile sulandırılan spermaların diğer sulandırıcılara oranla farkları önemli bulundu ($P<.0001$). Sulandırıcıların progresif motilite bulguları Tablo 4. 1.'de verilmiştir.

Tablo 4. 1. Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların Taze, Equilibrasyon Sonrası ve Çözündürme Sonrası Progresif Motilite bulguları

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibrasyon Sonrası	Çözündürme Sonrası	P
Andromed®	12,66 ± 1,07 ^{d,x}	0 ^{d,y}	0 ^{b,y}	<.0001
Bioxcell®	14,00 ± 1,30 ^{d,x}	1,33 ± 0,9 ^{d,y}	1,00 ± 0,72 ^{b,y}	<.0001
Bullxcell®	36,66 ± 4,64 ^{c,x}	18,30 ± 3,89 ^{c,y}	2,66 ± 1,07 ^{b,z}	<.0001
Optixcell®	47,00 ± 3,86 ^{a,b,x}	29,00 ± 3,20 ^{b,y}	6,00 ± 1,48 ^{a,z}	<.0001
Steridly®	40,00 ± 3,04 ^{c,b,x}	19,66 ± 1,98 ^{c,y}	2,33 ± 1,36 ^{b,z}	<.0001
Tris	55,00 ± 2,71 ^{a,x}	36,33 ± 1,50 ^{a,y}	6,00 ± 1,00 ^{a,z}	<.0001
P	<.0001	<.0001	<.0001	

*Sütunlar (a,b,c,d) ve satırlar (x,y,z) içinde farklı üst simge harfleri olan sayılar önemli ölçüde farklılık gösterir.

Ölü spermatozoon oranlarının sulandırıcılar arasında karşılaştırılmasında her üç zamanda da Andromed® ve Bioxcell® sulandırıcıları ile sulandırılan spermaların değerleri anlamlı derecede farklı bulundu ($P<.0001$). Taze sperma örneklerinde Tris sulandırıcısında en az ölü spermatozoon oranı tespit edildi. Çözündürme sonrası yapılan değerlendirmede Bullxcell®, Optixcell®, Steridly® ve Tris sulandırıcıları arasında önemli bir fark belirlenmedi. Sulandırıcılar arası ve her 3 zamanda ki ölü spermatozoon oranları Tablo 4. 2.'de verilmiştir.

Tablo 4. 2. Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Ölü Spermatozoon oranları

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibasyon sonrası	Çözdürme Sonrası	P
Andromed [®]	43,80 ± 0,87 ^{a,x}	66,93 ± 0,89 ^{a,y}	83,46 ± 1,01 ^{a,z}	<.0001
Bioxcell [®]	42,40 ± 1,07 ^{a,x}	63,13 ± 1,82 ^{a,y}	78,20 ± 1,71 ^{a,z}	<.0001
Bullxcell [®]	30,73 ± 2,22 ^{b,x}	44,26 ± 3,36 ^{b,y}	71,53 ± 2,02 ^{b,z}	<.0001
Optixcell [®]	25,93 ± 1,68 ^{d,c,x}	35,53 ± 2,25 ^{d,c,y}	70,00 ± 2,74 ^{b,z}	<.0001
Steridly [®]	28,73 ± 1,49 ^{b,c,x}	39,26 ± 1,38 ^{b,c,y}	71,66 ± 2,45 ^{b,z}	<.0001
Tris	22,00 ± 0,98 ^{d,x}	31,13 ± 1,06 ^{d,y}	65,30 ± 2,94 ^{b,z}	<.0001
P	<.0001	<.0001	<.0001	

*Sütunlar (a,b,c,d) ve satırlar (x,y,z) içinde farklı üst simge harfleri olan sayılar önemli ölçüde farklılık gösterir.

Baş anormali oranlarına bakıldığında sulandırıcıların kendi arasında her üç zamanda da önemli sayılacak bir fark bulunamadı (P <0.05). Baş anormalleri bulgularında taze ve çözdürme sonrası zamanları arasında baş anormal spermatozoa oranlarının karşılaştırıldığında, anlamlı derecede farklı oldukları tespit edildi. Sperma sulandırıcılarının baş anormali oranları Tablo 4. 3.'te verilmiştir.

Tablo 4. 3. Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Baş Anormali oranları

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibasyon sonrası	Çözdürme Sonrası
Andromed [®]	4,33 ± 0,26 ^a	4,86 ± 0,26 ^a	5,53 ± 0,26 ^a
Bioxcell [®]	4,13 ± 0,26 ^a	4,86 ± 0,26 ^a	5,46 ± 0,26 ^a
Bullxcell [®]	4,26 ± 0,26 ^a	4,60 ± 0,26 ^a	5,46 ± 0,26 ^a
Optixcell [®]	4,13 ± 0,26 ^a	5,00 ± 0,26 ^a	5,86 ± 0,26 ^a
Steridly [®]	3,73 ± 0,26 ^a	4,60 ± 0,26 ^a	5,40 ± 0,26 ^a
Tris	3,80 ± 0,26 ^a	4,93 ± 0,26 ^a	5,60 ± 0,26 ^a
P	0.05	0.05	0.05

Anormal spermatozoon bulgularından orta kısım anormallerinde ise Bioxcell[®] ve Steridly[®] suandırıcıları diğer sulandırıcılara kıyasla üç zamanda da (Taze sperma, equilibasyon sonrası ve çözdürme sonrası) önemli farklılık belirlendi (P<.0001). Taze ve çözdürme sonrası bulgular karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı derecede

farklılık gösterdi. Sulandırıcıların üç zamandaki orta kısım anormal bulguları Tablo 4. 4.'te verilmiştir.

Tablo 4. 4. Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Orta Kısım Anormali oranları

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibasyon sonrası	Çözdürme Sonrası
Andromed [®]	4,06 ± 0,24 ^b	4,33 ± 0,30 ^c	4,53 ± 0,30 ^c
Bioxcell [®]	10,20 ± 0,48 ^a	14,53 ± 0,55 ^a	16,73 ± 0,50 ^a
Bullxcell [®]	3,60 ± 0,28 ^b	4,20 ± 0,27 ^c	4,33 ± 0,36 ^c
Optixcell [®]	4,46 ± 0,23 ^b	4,06 ± 0,31 ^c	5,26 ± 0,26 ^c
Steridly [®]	11,13 ± 0,60 ^a	13,20 ± 0,52 ^b	13,33 ± 0,54 ^b
Tris	4,00 ± 0,29 ^b	3,40 ± 0,28 ^c	4,73 ± 0,30 ^c
<i>P</i>	> 0.001	> 0.001	> 0.001

*Sütunlar (a,b,c) farklı üst simge harfleri olan sayılar önemli ölçüde farklılık gösterir.

Anormal spermatozoon oranlarından kuyruk anormalinde ise yapılan değerlendirmede her üç zamanda da (Taze sperma, equilibasyon sonrası ve çözdürme sonrası) Bullxcell[®] sulandırıcısı ile sulandırılan spermada diğer sulandırıcılara oranla önemli derecede farklı olduğu belirlendi ($P < 0.0001$). Taze ile çözdürme sonrasında bulgulara bakıldığında ise Steridly[®] sulandırıcısı ile sulandırılan sperma örneklerinde bir artış gözlemlendi. Sulandırıcıların üç zamandaki kuyruk anormali bulguları Tablo 4. 5.'te verilmiştir.

Tablo 4. 5. Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Kuyruk Anormali oranları

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibasyon sonrası	Çözdürme Sonrası
Andromed [®]	11,86 ± 0,33 ^{b,c}	12,26 ± 0,48 ^{b,c}	12,33 ± 0,43 ^{b,c}
Bioxcell [®]	14,06 ± 0,51 ^a	12,46 ± 0,56 ^b	14,60 ± 0,54 ^a
Bullxcell [®]	10,33 ± 0,30 ^d	10,13 ± 0,48 ^d	10,53 ± 0,42 ^d
Optixcell [®]	12,13 ± 0,27 ^b	12,60 ± 0,36 ^b	12,66 ± 0,28 ^b
Steridly [®]	11,86 ± 0,82 ^{b,c}	14,53 ± 0,71 ^a	13,60 ± 0,76 ^{a,b}
Tris	10,60 ± 0,40 ^{c,d}	10,86 ± 0,50 ^{c,d}	10,93 ± 0,39 ^{c,d}
<i>P</i>	> 0.001	> 0.001	> 0.001

*Sütunlar (a,b,c,d) farklı üst simge harfleri olan sayılar önemli ölçüde farklılık gösterir.

Toplam anormal oranlarında ise yine üç zamanda da (Taze sperma, equilibasyon sonrası ve çözöürme sonrası) Bioxccl® ve Steridly® sulandırıcılarının diğler sulandırıcılara göre önemli farklılıkları olduğu belirlendi (P<.0001). Bütün sulandırıcıların taze ile çözöürme sonrası bulgularında anlamlı derecede fark gözlemlendi. Sulandırıcıların üç zamandaki toplam anormal oranları Tablo 4. 6.'de verilmiştir.

Tablo 4. 6. Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözöürme Sonrası Toplam Anormali oranları

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibasyon sonrası	Çözöürme Sonrası
Andromed®	20,93 ± 0,46 ^b	21,20 ± 0,57 ^b	21,46 ± 0,63 ^{c,d}
Bioxccl®	29,86 ± 0,85 ^a	32,46 ± 1,02 ^a	36,86 ± 0,70 ^a
Bullxccl®	18,06 ± 0,56 ^c	18,60 ± 0,63 ^c	18,60 ± 0,72 ^e
Optixccl®	21,53 ± 0,52 ^b	21,53 ± 0,63 ^b	22,80 ± 0,51 ^c
Steridly®	28,86 ± 1,16 ^a	32,86 ± 0,94 ^a	32,33 ± 0,90 ^b
Tris	18,40 ± 0,69 ^c	18,40 ± 0,74 ^c	20,00 ± 0,56 ^{d,e}
<i>P</i>	> 0.001	> 0.001	> 0.001

*Sütunlar (a,b,c,d,e) farklı üst simge harfleri olan sayılar önemli ölçüde farklılık gösterir.

Hipo-osmotik şişme testi (HOST) bulgularına baktığımızda taze ve equilibasyon sonrasında Andromed® ve Bioxccl® sulandırıcılarının diğler sulandırıcılara kıyasla önemli bir farkı tespit edildi(P<.0001). Çözöürme sonrasında ise önemli bir fark tespit edilmedi (P<.0001). Sulandırıcıların üç zamandaki hipo-osmotik şişme testi oranları Tablo 4.7.'da verilmiştir.

Tablo 4. 7. Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların Taze, Equilibasyon Sonrası ve Çözdürme Sonrası Host bulguları

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibasyon sonrası	Çözdürme Sonrası	P
Andromed®	22,53 ± 0,93 ^{d,x}	19,00 ± 0,83 ^{d,y}	7,20 ± 0,65 ^{a,z}	<.0001
Bioxcell®	22,60 ± 1,14 ^{d,x}	18,66 ± 0,97 ^{d,y}	8,46 ± 0,81 ^{b,a,z}	<.0001
Bullxcell®	42,26 ± 0,55 ^{c,x}	25,70 ± 0,55 ^{c,y}	9,46 ± 0,99 ^{b,a,z}	<.0001
Optixcell®	51,40 ± 1,03 ^{b,x}	35,80 ± 0,78 ^{b,y}	10,86 ± 1,10 ^{b,z}	<.0001
Steridly®	44,40 ± 0,45 ^{c,x}	24,20 ± 0,39 ^{c,y}	11,13 ± 0,82 ^{b,z}	<.0001
Tris	63,40 ± 0,78 ^{a,x}	42,66 ± 0,83 ^{a,y}	8,66 ± 0,96 ^{b,a,z}	<.0001
P	< 0.001	< 0.001	0.05	

*Sütunlar (a,b,c,d) ve satırlar (x,y,z) içinde farklı üst simge harfleri olan sayılar önemli ölçüde farklılık gösterir.

Manda et, süt ve deri gibi ürünlerin yanında iş gücü olarak da asırlardır insanların faydalandığı bir hayvan türüdür. Her türlü iklim koşullarına ve hastalıklara olan dayanıklılığı, yemden yararlanmasının fazla olması ve yetiştirme giderlerinin diğer türlere göre daha az olması, manda yetiştiriciliğinin tercih edilmesinin nedenleri arasında sayılabilmektedir (Küçükkebabcı ve Aslan, 2002). Süt ve süt ürünleri (yoğurt, kaymak vb.) üretiminde kullanılması yanında et ve et ürünlerinin (sucuk, pastırma vb.) üretiminde de yoğun olarak kullanılmaktadır (Soysal, 2013). Manda yetiştiriciliğinin giderek azalmasının nedenlerinin düşük üreme verimliliği, olgunluk ve ergenliğe geç ulaşması, östrus belirtilerinin zayıf olması, düşük gebelik oranları, uzun olan doğum sonrası anöstrus ve buzağılama aralıkları gibi olumsuzluklar olarak sıralanabilir (Arrighi, et al., 2010). Çalışmamızda erkek mandaların kullanılmasının nedeni Ondokuzmayıs Üniversitesinin bulunduğu şehir olan Samsun’da manda popülasyonunun fazla olması (aynı oranla manda ürünlerinin fazla üretilmesi) ve Türkiye’de ve dünyada mandaların fertiliteleri üzerine yapılan çalışmaların az olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Erkek mandalarda ergenlik çağı yaş ve vücut ağırlığına göre değişkenlik gösterir. Ancak vücut ağırlığına nazaran yaş daha önemli bir belirteçtir. İyi şartlarda yetiştirilen erkek mandalarda spermatojenik hücre bölünmesi yaklaşık 12. aydan itibaren başlar. 15. Aydan itibaren de aktif spermatogenezis görülebilir. Motil spermatozoanın ejakulatta görülmesi ise 24-30. aylardan sonra görülmeye başlar

(Perera, 2008). Yapılan çalışmalarda da üç yaşında ya da daha yaşlı olan erkek mandalar kullanılmıştır (Herold, et al., 2004b; Selcuk ve Akal, 2015; Asr, et al., 2011). Çalışmamızda kullandığımız hayvan materyalimiz 3 yaşından büyük mezbahaneye kesime gelmiş erkek mandalar arasından tercih edilmiştir.

Epididimisler vücutta spermlerin depolandığı yerdir. Yapılan araştırmalar mandaların kauda epididimislerinde toplanan spermlerin ejakule spermlerle aynı kalitede olduğunu ve suni tohumlama için güvenilir olduklarını bildirmişleridir (Lambrechts, et al., 1999; Herold, et al., 2004a; Yulnawati, et al., 2010; Hiron, et al., 2006). Yapılan çalışmalar epididimal ve ejakule sperma arasında kayda değer bir fark olmadığını göstermiş olduğundan mezbahada kesilen ve genetik materyali boşa gidecek olan mandaların gen kaynağı olarak kullanılması amacıyla çalışmamızda epididimal manda spermaları kullanılmıştır.

Mandalarda kesim sonrası epididimisteki spermatozoonlara zarar vermemek için testislerin laboratuvara en hızlı şekilde getirilmesi ve ivedilikle işlenmesi gerekmektedir. Martinez-Pastor, et al., (2005) yılında yaptıkları çalışmada ölüm sonrası spermatozoonu etkileyen faktörlerden birinin de epididimisin saklanma süresine bağlı olarak ortaya çıkan epididimal lümendeki pH düşüşüne bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda mezbahada kesilen erkek mandalardan alınan testislerin 30 dakika ile 4 saat içerisinde işlenmiş olduğu gözlenmiştir (Lambrechts, et al., 1999; Herold, et al., 2004a). Barati, et al., (2009) yılında yaptıkları çalışmada elde edilen testisleri belli süreler muhafaza etmiş en iyi sonuçları hemen işlenmiş epididimis spermatozoonlarında tespit etmişlerdir. Yaptığımız araştırmada yapılan çalışmalar ışığında; mandalar mezbahada kesildikten sonra en kısa sürede testisler mandalardan alınmış minimum 30 dakika maksimum 4 saat içerisinde işleme alınıp dondurma işlemine geçilmiştir.

Vilela, et al., (2017) yılında gliserolün sperma sulandırıcısına eklenme zamanının belirlenmesi için yaptıkları çalışmada 5 °C'ye 2 saatte yavaş soğutulan Tris sulandırıcısına dondurmadan önce farklı zamanlarda gliserol ilavesi yapılmış; gliserol ile birkaç dakika inkube edilmiş sperma ile saatlerce gliserolle inkube edilmiş spermanın benzer motil sperma yüzdesine sahip olduğunu bildirmişler ve bu işlemde en önemli bölümün yavaş soğutma ile equilibrasyon olduğunu belirtmişlerdir. Herold, et al., (2004b) equilibrasyon süresinin araştırıldığı çalışmalarında 2 ila 9 saat arasında equilibrasyona bırakılan spermalar içinde 4

saatten az equilibrasyon süresinin spermanın spermatolojik parametreleri üzerine olumsuz bir etkiye neden olduğunu bildirmişlerdir. Shahverdi, et al., (2014) yılında yapmış olduğu çalışmada farklı equilibrasyon sürelerinin (2, 4, 8 ve 16 saat) çözüm sonu motiliteye etkisini araştırmış ve 4 saatlik equilibrasyon süresinin diğer zamanlara göre daha güvenilir olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda sulandırma işlemleri tamamlanmış spermalar payetlere çekilmiş 37 °C'den 4 °C'ye yavaş soğutarak 4 °C'de 4 saat equilibrasyonda bırakılmıştır. Daha sonra payetler 20 dakika boyunca sıvı nitrojen yüzeyinden 6 cm üzerinde nitrojen buharında dondurulmuş ve sonrasında ise sıvı nitrojende saklanmıştır (Lambrechts. et al., 1999; Asr. et al., 2011). Yapmış olduğumuz çalışmamızda 4 °C de 4 saatlik inkubasyonda bırakılan payetler daha sonra sıvı azot yüzeyinin 6 cm yukarısında 20 dakika bekletilerek donduruldu ve sonrasında sıvı azotun içinde saklandı.

Dudeja, (1990) yılında yaptığı çalışmada dondurulmuş manda spermasını çeşitli sıcaklık dereceleri ve zamanlarında (4 °C'de 4 dakika, 37 °C'de 30 saniye ve 75 °C'de 9 ± 1 saniye) çözülmesinin sonuçlarını değerlendirmiştir. Yapmış olduğu çalışmada dondurulmuş manda spermasının 35 °C'de 30 saniye süre ile çözülmesinin doğurganlıkla doğrudan bağlantılı olan tatmin edici çözülme sonrası hareketliliği sağladığı sonucuna varmıştır. Arriola and Foote, (1987) yılında benzer bir çalışmada ise çözülme sıcaklık değerini 30 °C değerlerinde olması gerektiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda sulandırılıp dondurulan sperma örnekleri yapılan çalışmalar göz önünde tutularak 37 °C'de 30 saniyede çözülme işlemine tabi tutulmuştur.

Siddique, et al., (2006) yılında yapmış oldukları sulandırıcıların denendiği çalışmada ikili tampon kullanılacaksa Tris ve sodyum sitrat içeren sulandırıcıları tek tampon kullanılacaksa Tris sulandırıcısı kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada epididimal manda sperması sulandırıcısı olarak Tris sulandırıcısı kullanılmış çalışmada buna ilave olarak askorbik asit ilavesinin de çözülme sonrası hareketlilik canlılık ve minimum anormallik tespit etmişlerdir (Saurabh, et al., 2018). Bir başka çalışmada manda spermasının sulandırılmasında Tris sulandırıcısı kullanılmış kullanılan bu sulandırıcıya Trehaloz ilavesinin de sperma kalitesini ve in vivo doğurganlığı iyileştirildiğini bildirmişlerdir (Iqbal, et al., 2016). Yapılan başka bir çalışmada hücre dışı kriyoprotektan olarak şekerin varlığının, dengeleme ve çözülmeden sonra spermatozoanın kalitesini arttırabildiğini bildirmişlerdir (Yıldız, ve ark., 2000). Rehman, et al., (2012) Yaptıkları çalışmada

hücre zarına koruma sağlamak için şeker bileşenlerinin kullanımının gerekli olduğunu bildirmiş ve sulandırıcıda şeker kullanımı üzerine yapmış oldukları çalışmada şeker kullanılmamış ve çeşitli şekerlerin (Fruktoz, Laktoz, ve Glukoz) kullanıldığı sulandırıcıları karşılaştırılmış spermatozoonun hücre zarının hareketliliği ve sağlamlığı için fruktoz kullanılmasının diğer şekerlere oranla daha üstün olduğu tespit edilmiştir. Gliserol donma işlemi sırasında spermatozoayı soğuk şokundan korumak için kullanılan iyi bir kriyoprotektandır. Hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonunu dengelemek için spermatozoa hücrelerine nüfus eder. Spermatozoa hücreleri için tehlikeli olmayan küçük ve yumuşak buz kristalleri oluşturarak hücreyi soğuk şokuna karşı korur (Salamon and Maxwell, 2000). Herbowo, et al., (2019) yılında yapmış oldukları gliserol ve dimetilformamid (DMF) kriyoprotektanlarının ve dozlarının karşılaştırıldığı çalışmalarında manda spermasının dondurulmasında % 7 oranında spermaya katılan gliserolün en iyi sonuçları verdiğini bildirmişlerdir. Rasul, et al., (2007)'de manda spermasına ilave edilen gliserollü sulandırıcıya katılan DMSO'nun gliserolün donarak korunma yeteneği üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada sulandırıcıya katılan DMSO'nun sperma üzerinde zararlı bir etkiye sebep olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda da sperma sulandırıcısına kriyoprotektan olarak % 7 gliserol ilavesi yapılmıştır (Hiron, et al., 2006; Asr, et al., 2011; Eriani, et al., 2017). Yumurta sarısının spermanın dondurulmasında koruyucu etkisinin olduğu bilinmektedir (Parks, 1997). Yapılan çalışmalarda epididimal manda spermasının dondurulmasında genel olarak % 20 oranında yumurta sarısı ilavesi yapılmıştır (Barati, et al., 2009; Asr, et al., 2011; Valette, et al., 2015). Çalışmamızda da Tris sulandırıcısı olarak Tris, Sitrik asit, Fruktoz, Gliserol ve yumurta sarısı içeren sulandırıcı kullanılmıştır.

Araştırmamızda 6 (5'i ticari preparat 1'i Tris Sulandırıcısı olmak üzere) ayrı sulandırıcının taze, equilibrasyon sonrası ve dondurulup-çözdürülme sonrası olmak üzere 3 ayrı aşamadaki spermatolojik muayeneleri (Motilite, Ölü-Canlı Spermatozoa Oranı, Anormal Spermatozoa Oranı ve HOST Testi) yapıp elde edilen bulgular değerlendirilmiştir. Motilite sonuçları sulandırıcılar kendi arasında karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklı sonuçlar vermiştir. Aynı zamanda 3 farklı aşamada da her sulandırıcı anlamlı derecede farklılık göstermiştir. Andromed ve Bioxcell sulandırıcılarından diğer sulandırıcılara kıyasla daha düşük sonuçlar elde edilmiştir. Tris ve Optixcell sulandırıcılarından ise diğer sulandırıcılara kıyasla her

üç aşamada da daha başarılı veriler alınmasına karşın dondurulup-çözdürme sonrası alınan sonuçlar istenilen düzeylere ulaşamamıştır. Yapılan bir çalışmada Lessard, et al., (2009) Amerikan bufalolarından alınan epididimal spermatozoaları Triladyl ve Andromed sulandırıcısı ile sulandırmış Triladyl sulandırıcısı ile sulandırılan gruptan çözüm sonu ortalamasını % 12 ila % 17,2 arasında progresif motilite elde ederken Andromed sulandırıcısı ile sulandırılan gruptan ise hiç progresif motilite elde edememişlerdir. Herold, et al., (2004) epididimal manda spermalarında yaptıkları çalışmada epididimal manda spermatozoalarını Andromed ve Triladyl sulandırıcıları ile sulandırmış ve çözüm sonu progresif motilitelerini sırasıyla % 13 ve % 18 olarak bildirmişlerdir. Herold, et al., (2006) yılında yaptıkları benzer bir çalışmada da Andromed ve Triladyl sulandırıcıları ile spermatozoalarını sulandırmış ve çözüm sonu progresif motilite oranlarını benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Barati, et al., (2009) yılında yapmış oldukları çalışmada Tris ve tam yağlı inek sütünü epididimal manda spermasında sulandırıcı olarak kullanmış çözüm sonu motilite oranlarını sırasıyla % 11,6 ve % 16,5 olarak bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmaların sonuçları araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzerlik göstermektedir.

Akal, (2014) yılında yayınlanmış olduğu çalışmasında epididimal manda spermasını Bioxcell sulandırıcısı ile sulandırmış progresif motiliteyi taze spermada %50 dondurulmuş çözdürülmüş spermada % 27,50 olarak bulmuştur. Camargos, et al., (2013a)'te 18 aylık erkek murrah mandasının epididimisleri üzerinde yağsız süt bazlı Botu-bov (BB) ve Tris sulandırıcısı ile yapmış oldukları çalışmada çözüm sonu progresif motiliteyi sırasıyla % 27,25 ve % 18,00 olarak bildirmişlerdir. Rizal, et al., (2007) yılında epididimal manda spermasının sulandırılmasında Andromed sulandırıcısına belli oranlarda ilave edilen sükrozun sperma kalitesine etkisini araştırmış, ticari bir preparat olan Andromed sulandırıcısına sükroz eklenmesinin çözülmeden sonra epididimal manda spermasının kalitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Vilela, et al., (2017)'de yapmış oldukları çalışmada bison epididimal spermasında progresif motiliteyi dondurma öncesinde % 73 dondurma çözdürme sonrasında da % 21 olarak tespit etmişlerdir. Singh, et al., (2007) yılında yapmış oldukları çalışmada epididimal manda spermatozoasını Tris sulandırıcısı ile sulandırmış dondurma öncesi progresif motiliteyi % 71 dondurma çözdürme sonrası ise progresif motiliteyi ise % 52 olarak bildirmişlerdir. Bizim araştırmamızda elde

ettiğimiz sonuçların bu çalışmalara kıyasla dondurma öncesi ve çözüm sonu değerlerin düşük olması; mandaların beslenme yetersizliği, vücut kondüsyonlarının iyi olmaması, kesim zamanı, mezbahaya getirilirken ki ulaşım ve kesim alanında yaşadıkları stres gibi nedenlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda equilibrasyon sonrası değerlerin bildirildiği çalışmalara rastlanılmamıştır.

Mandalarda epididimal spermaların ölü spermatozoa oranlarının araştırıldığı çalışmalarda birçok bilgiler elde edilmiştir. Lambrechts, et al., (1999), ölü spermatozoa oranını 1995 ve 1996 yıllarında yaptıkları çalışmada değerlendirmiş ve bu yıllar için dondurma öncesi sırasıyla % 9,6 ve % 15,6 olarak dondurulmuş çözdürülmüş spermada ise yine sırasıyla % 43 ve % 43,7 olarak bildirmişlerdir. Kumar, et al., (2008), çalışmalarında ölü spermatozoa oranını dondurma öncesi spermada % 17,67, dondurma çözündürme sonrası ise % 34,83 olarak bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada elde edilen ölü spermatozoa oranı dondurma öncesi % 16,4, çözüm sonu ise % 32,1 olarak tespit etmişlerdir (Singh, et al., 2007). Hiron, et al., (2006), epididimal manda spermasında yapmış oldukları çalışmalarında dondurma öncesi ölü spermatozoa oranını % 16,08, dondurma çözündürme sonrası ölü spermatozoa oranını ise % 31,33 olarak tespit etmişlerdir. Akal, (2014) epididimal manda spermalarında yapmış olduğu çalışmada taze ve dondurulmuş çözdürülmüş spermada ölü oranını sırasıyla % 16,58 ve % 36,76 olarak bildirmiştir. Çalışmamızda sulandırıcılar arasında ölü spermatozoa oranlarına baktığımızda hem taze hemde çözündürme sonrasında Tris ve Optixcell sulandırıcılarının en düşük oranları verdiği gözlemlendi. Sulandırıcılar arasında en yüksek ölü spermatozoa oranlarını da AndroMed sulandırıcısından elde edildiği tespit edildi. Yaptığımız araştırmamızda mandaların epididimal spermalarının ölü spermatozoa oranı yapılan diğer çalışmalara göre yüksek bulunmuştur. Elde ettiğimiz ölü spermatozoa oranlarının diğer çalışmalardaki oranlara göre yüksek olması, elde edilen düşük motilite değerlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Epididimal manda spermalarının spermatolojik muayanelerinde anormal spermatozoa oranlarını inceleyen çeşitli yayınlar vardır. Akal, (2014)'te Bioxcell sulandırıcısı kullanarak yapmış olduğu çalışmada taze ve dondurulmuş çözdürülmüş sperma arasında baş anormali dışında diğer anormal bulgularında anlamlı derece de farklılık bulmuştur. Taze ve dondurulmuş çözdürülmüş sperma da sırasıyla baş %

3,38 ve % 3,5 orta kısım % 15,00 ve % 22,10 kuyruk % 13,68 ve % 17,30 toplamda % 32,06 ve % 42,90 olarak bildirmiştir. Lambrechts, et al., (1999), 1995 ve 1996 yıllarında epididimal manda spermasında yapmış olduğu çalışmada toplam anormal oranlarını sırasıyla % 31,3 ve % 24,7 olarak tespit etmiştir. Yulnawati, et al., (2010) da ejakule ve epididimal bufalo spermalarını karşılaştırdıkları çalışmada ejakule ve epididimal spermatozoasında dondurma öncesi anormal oranını sırasıyla % 6,5 ve % 15,0 olarak tespit etmişlerdir. Selçuk ve Akal, (2015) yapmış oldukları çalışmada baş anormalini taze ve dondurulmuş çözündürülmüş olmak üzere % 2,5 ve % 3,3 orta kısım anormalini % 14,5 ve % 24,6 kuyruk anormalini % 7,6 ve % 30,5 toplam anormal oranını ise % 24,6 ve % 58,4 olarak bildirmişlerdir. Harissatria et al., (2019) yılında yapmış oldukları çalışmalarında epididimal manda sperma sulandırıcısına % 20 serum ilavesinin anormal spermatozoa oranını % 23,5'ten % 14,20'ye düşürdüğünü bildirmişlerdir. Yeni ve Avdatek, (2017) yapmış oldukları çalışmada taze epididimal spermasında ki anormal oranlarını baş, orta kısım, kuyruk ve toplam olmak üzere sırasıyla % 3,0, % 14,0, % 6,4 ve % 23,4 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda sulandırıcılar arasında baş anormali oranlarında hem taze hem de çözdürme sonrası herhangi bir fark tespit edilemedi. Orta kısım anormalinde ise Bioxcell ve Steridly sulandırıcıları hem taze hem de çözdürme sonrası oranlara bakıldığında diğer sulandırıcılara kıyasla daha yüksek oranlarda olduğu gözlemlendi. Toplam anormal oranlarına baktığımızda ise Tris ve Optixcell sulandırıcıları hem taze hem de çözdürme sonrası en düşük anormal oranlarını verirken taze ve çözdürme sonrası en yüksek anormal oranı ise Bioxcell sulandırıcısına aitti. Yaptığımız araştırmada elde ettiğimiz anormal bulguları ile yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında genel itibariyle uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda spermatozoonların membran bütünlüğü HOST testi yapılarak ölçülmüştür. Yulnawati, et al., (2010) manda spermalarında ejakule ve epididimal spermanın karşılaştırıldığı çalışmalarında Andromed sulandırıcısı ile sulandırılan spermatozoonlarda membran bütünlüğünü dondurma öncesinde ejakule de % 77,5 epididimalde % 79 olarak dondurma sonrasını ise sırasıyla % 47,33 ve % 67,33 olarak tespit etmişlerdir. Singh, et al., (2007) de yapmış oldukları çalışmada epididimal manda spermatozoasında dondurma öncesi ve çözdürme sonrasında sırasıyla HOST testi sonuçlarını % 72,7 ve % 59,4 olarak bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise bufalo spermasında membran bütünlüğü HOST testi ile belirlenmiş

dondurma öncesi % 71,33 bulunurken dondurulmuş çözdürülmüş spermada % 58,17 olarak tespit edilmiştir (Kumar, et al., 2008). Ejakule manda spermasında yapılan bir başka çalışmada ise sulandırıcı olarak Tris ve Bioxcell sulandırıcıları kullanılmış yapılan HOST testi sonuçlarına göre dondurma-çözdürme sonrası sırasıyla % 42,92 ve % 45,96 olarak kayıtlara geçmiştir (Asr, et al., 2011). Yapılan çalışmalarda ki sonuçlar araştırmamızdaki elde ettiğimiz sonuçlara nazaran daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni olarak çalışmamızdaki düşük motilite değerleri ve yüksek ölü spermatozoa oranı olduğu düşünülmektedir.



5. SONUÇ

Yaptığımız araştırmada farklı sperma sulandırıcıları ile sulandırılan epididimal manda spermasının kısa süreli kullanımı için hazırlanan taze spermanın uzun süreli kullanım için gerekli olan dondurma işlemine göre daha yararlı olduğunu söylenebilir. Diğer bütün memeli hayvan ırklarında olduğu gibi epididimal manda spermasında dondurma çözündürme işleminden önemli ölçüde etkilendiği ve büyük oranda zarara yol açtığı sonucuna varılmıştır. Elde ettiğimiz epididimal manda spermalarında taze ve çözüm sonrası progresif motilite sonuçları yapılan çalışmalarla paralellik göstermiş ve herhangi bir nedenle kesime sevk edilen manda testislerinden elde edilen epididimal spermatozoonlarının biyoteknolojik yöntemlerde (suni tohumlama gibi) kullanılabileceği düşünülmektedir.

Yaptığımız araştırmada kullanılan epididimal manda spermasının sulandırma solüsyonları taze ve çözündürme sonrası progresif motilite yönünden incelendiğinde ticari preparatlardan, Optixcell (Taze % 47 – Çözündürme sonrası % 6), Steridly (Taze % 40 - Çözündürme sonrası % 2,33) ve Bullxcell'den (Taze % 36,66 - Çözündürme sonrası % 2,66) -diğer iki ticari sulandırıcı olan AndroMed ve Bioxcell sulandırıcılarına kıyasla- progresif motilite açısından daha iyi sonuçlar alınmıştır. Ancak Ticari preparat olmayan ve en yaygın şekilde kullanılan Tris sulandırıcısının bütün sulandırıcıların progresif motiliteleri (Taze % 55 – çözündürme sonrası % 6) incelendiğinde ticari sulandırıcılara oranla daha iyi olduğu kanaatine varılmıştır. Ölü spermatozoon oranına baktığımızda da yine en iyi sonuçları sırasıyla taze ve çözündürülmüş spermada Tris (% 22,00 - % 65,30), Optixcell (% 25,93 - % 70,00) ve Steridly (% 28,73 - % 71,66) sulandırıcılarının verdiğini görebiliriz. Baş, orta kısım ve kuyruk anomalilerinin toplamında, toplam anormal oranında da taze ve çözündürme sonrası en düşük değerleri Tris (% 18,40 - % 20,00), Bullxcell (% 18,06 - % 18,60) ve Optixcell (% 21,53 - % 22,80) sulandırıcıları vermişlerdir. HOST Oranlarında da en iyi sonuçları veren sulandırıcılar taze ve çözündürme sonrası, Tris (% 63,40 - % 8,66) ve Optixcell (%51,40 - % 10,86) sulandırıcıları olmuşlardır.

Çalışmamızda kullanılan sperma sulandırıcıları arasında spermatolojik parametreler değerlendirildiğinde Tris (3,028 gr Tris, 1,675 gr sitrik asit, 1,25 gr früktoz, % 7 gliserol ve % 20 yumurta sarısı) sulandırıcısının hem taze hem de dondurulup-çözündürülmüş spermada en iyi sonuçları veren sperma sulandırıcısı olduğu söylenebilir.

Araştırmamızın, Mandalarda yapılacak suni tohumlama ve üreme biyoteknolojisi konularında yapılacak çalışmalara yardımcı olabilecek mevcut metotların iyileştirilmesi ile Anadolu mandasının verimliliğinin arttırılmasına olanak sağlayacağı düşünölmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abdou, M. S. S., El-Guindi, M. M., El-Menoufy, A. A. and Zaki, K. (1978). 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. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 25, 814.
- Acott, T. S. and Carr, D. W. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biology of Reproduction*. 30, 926-935.
- Ahmad, N., Umair, S., Shahab M. and Arslan M. (2010). Testicular development and establishment of spermatogenesis in nili-ravi buffalo bulls. *Theriogenology*. 73, 20-25.
- Akal, E. (2014). Mandalardan postmortem elde edilen spermalarda dondurmanın dna hasarı ve bazı spermatolojik parametreler üzerine etkisi. Doktora tezi. Ondokuzmayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama (Veteriner) Anabilim Dalı. Samsun.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha B. A., Andrabi, S. M. H., Iqbal, S. and Ullah N. (2010). Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in bioxcell® extender. *Theriogenology*. 74, 951-955.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Andrabi, S. M. H., Rakha B. A., Ullah N. and Khalid M. (2012). Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction Domestic Animals*. 47 (5), 815-819.
- Aksoy, M. ve Tekin, N. (1991). Mandalarda çeşitli yöntemlerle östrusun belirlenmesi. Doğa-TR. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 17, 119-125.
- Aksoy, M. ve Tekeli, T. (1993). Mandalarda üreme özellikleri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 33 (1-2), 85-94.
- Andrabi, S. M. H. Ansari, M. S. Ulah, N. Anwar, M. Mehmood, A. and Akhter, S. (2008). Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 104, 427-433.
- Andrabi, S. M. H. (2009). Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus Bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction Domestic Animals*. 44, 552-569.
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Akhter, S. and Ashiq, M. (2016). Optixcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*. 85, 528-532
- Arrighi, S., Bosi, G., Groppetti, D. and Cremonesi, F. (2010). Morpho- and histometric evaluations on the testis and epididymis in buffalo bulls during the different reproductive seasons. *The Open Anatomy Journal*. 2, 29-33.
- Arriola, J. and Foote, R. H. (1987). Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *Journal of Dairy Science*. 70, 1664- 1670.
- Asr, S. T. Beheshti, R. and Kohram, H. (2011). The evaluations of tris-citrate acid or bioxcell extenders on the post-thawed buffalo sperm parameters. *Annals of Biological Research*. 2 (4), 360-365.
- Atasever, S. ve Erdem, H. (2008). Manda yetiştiriciliği ve türkiye'deki geleceği. *Omü Ziraat Fakültesi Dergisi*. 23 (1), 59-64.
- Bailey, J., Morrier, A. and Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*. 83, 393-401.

- Bhakat, M., Mohanty, T. K., Gupta, A. K., Chakravarty, A. K., Singh, P. and Abdullah, M. (2015). Effect of HS and BQ vaccination on semen quality parameters of murrah buffalo bulls. *Journal of Infection and Molecular Biology*. Vol; 3-1, 24-27.
- Barati, F., Khaksary Mahabady, M. and Mohammadi, Gh. (2009). Cryopreservation of in situ cool stored buffalo (*Bubalus bubalis*) epididymal sperm. *Iranian Journal of Veterinary Research*. Shiraz University, Vol. 10 (4), Ser. No. 29.
- Barile, V. L. (2005). Improving reproductive efficiency in female buffaloes. *Livestock Production Science*. 92, 183–194.
- Barile, V. L. (2005). "Reproductive efficiency in female buffaloes". Antonio Borghese (ed.). *Buffalo Production and Research*. (s. 77-108). Rome.
- Bertol, M. A. F. (2016). Cryopreservation of epididymal sperm. *Cryopreservation in Eukaryotes*. 121-135.
- Blesbois, E. (2007). Current status in avian semen cryopreservation. *Worlds Poultry Science Journal*. 63, 213–222.
- Büyükleblebici, S. (2012). Farklı sulandırıcılar ile dondurulan boğa spermasında in vitro ve in vivo değerlendirmeler. Doktora Tezi. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. Ankara.
- Camargos, A. S., Oba, E., Monteiro, G. A., Sancler-Silva, Y. F. R., Zorzetto, M., Maziero, R. R. D., Papa, F. O. and Ramos, A. A. (2013a). Comparison of botu-bov and tris as freezing extenders of buffalo sperm recovered from epididymal cauda. *Buffalo Bulletin*. Vol.32 (Special Issue 2), 484-486
- Camargos, A. S., Oba, E., Monteiro, G. A., Sancler-Silva, Y. F. R., Zorzetto, M., Maziero, R. R. D., Papa, F. O. and Ramos, A. A. (2013b). Adding motility stimulants to improve freezing of buffalo sperm recovered from epididymal cauda. *Buffalo Bulletin*. Vol.32 (Special Issue 2), 487-488
- Chatterjee, S., De Lamirande, E. and Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: Protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development*. 60, 498–506.
- Chinnaiya, G. P. and Ganguli, N. C. (1980). Acrosomal damage of buffalo spermatozoa during freezing in extenders. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 27, 339-342
- De Castro, S. R. S., Morini, A. C., Da Silva, A. S. L., Neves, K. A. L., Minervino, A. H. H., Meneses, A. A. M. and Vale, W. G. (2017). Influence of seasonality on buffalo semen. *Animal and Veterinary Sciences*. 5, 45-51.
- Dellal, G. (1994). Dişi mandalarda üreme. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*. 4 (1), 55-56
- Dudeja, S. (1990). Effect of temperature of thawing and diluent on the post-thaw physiological changes of buffalo frozen semen. *Indian Journal Physiology Pharmacology*. 34 (4), 267-270.
- El-Menoufy, A. A., Seida, A. A., Fattouh, El-S. M. and Abdou-Ahmed, M. M. (1986). Effect of caffeine on metabolic activity of ejaculated and epididymal spermatozoa of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Reproduction in Domestic Animals*. 21, 214-219
- Eriani, K., Sari, N., Rosnizar, Dasrul, Suhartono, S. and Rizal, M. (2017). Cryopreservation of aceh swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) semen with combination of glycerol and lactose. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*. 9 (3), 409-416.
- FAO, (2020). <http://www.fao.org/home/en>
- Fattouh, S. M. and Abdou, M. S. S. (1991). Effect of caffeine on the post-thaw motility of buffalo spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 36 (1), 149-154

- Gao, D., Mazur, P. and Critser, J. K. (1997). Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive Tissue Banking*. San Diego, Academic Press 263-327.
- Griswold, M. D. (1998). The central role of sertoli cells in spermatogenesis. *Cell & Developmental Biology*. Vol 9, 411-416.
- Harissatria, Surtina, D., Astuti, T., Jaswandi and Hendri. (2019). Viability spermatozoa epididymis of buffalo (*Bubalus Bubalis*) in fertilized media to additional serum at temperature 5 °C. IOP Conf. Series: *Earth and Environmental Science*. doi:10.1088/1755-1315/347/1/012008
- Haybis, (2020). Tarım ve Orman Bakanlığı Hayvancılık Bilgi Sistemi. <https://hbs.tarbil.gov.tr>
- Herbowo, M. T., Arifiantini, R. I., Karja, N. W. K. and Sianturi, R.G. (2019). Cryopreservation of swamp buffalo semen in skim milk yolk-based diluent with two different cryoprotectants. *Tropical Animal Science Journal*. 42 (1), 13-18.
- Herdis, Surachman M., Yulnawati, Rizal, M., and Maheshwari, H. (2008). The viability and membrane integrity of spotted buffalo epididymal sperm in addition of maltose into andromed extender. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 33 (2), 101-106.
- Herold, F. C. Aurichb, J. E. and Gerber, D. (2004a). 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*. 61, 715–724.
- Herold, F. C. Haas, K. D. Cooper, D. Colenbrander, B. Nöthling, J. O. Theunisen, W. Spillings, B. and Gerber, D. (2004b). 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*. 71, 203–210.
- Herold, F. C. Haas, K. D. Colenbrander, B. and Gerber, D. (2006). Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from african buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. *Theriogenology*. 66, 1123–1130.
- Heuer, C., Tahir, M. N. and Amjad, H. (1987). Effect of season on fertility of frozen buffalo semen. *Animal Reproduction Science*. 13, 15-21.
- Hiron, M. H. Singh, L.P. Arangasamy, A. Ansari, M. R. and Kumar, S. (2006). Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 93, 124–133.
- Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62, 3–22.
- Iqbal, S., Naz, S., Ahmed, H. and Andrabi, S. M. H. (2016). Cryoprotectant effect of trehalose in extender on post-thaw quality and in vivo fertility of water buffalo (*Bubalus Bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia*. 12794, 1-6.
- Jainudeen, M. R., Bongso, T. A. and Dass, S. (1981). Semen characteristics of the swamp buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Animal Reproduction Science*. 4, 213-217.
- Kadirvel, G. Kumar, S. and Kumaresan, A. (2009). 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*. 114, 125–134.

- Kök, S. (1996). Marmara ve Karadeniz bölgesinin çeşitli illerindeki manda populasyonlarının kimi morfolojik ve genetik özellikleri üzerine bir araştırma, Doktora Tezi, Tekirdağ.
- Kumar, A. Singh, L. P. Hiron, H. M. and Majumdar, A.C. (2008). Seminal plasma non-heparin binding proteins (NHBP) reduce the cryoinjury to buffalo cauda epididymal spermatozoa induced by heparin binding proteins (HBP). *Animal Reproduction Science*. 104, 220–226.
- Kumar, N., Lone, S. A., Prasad, J. K., Jan, M. H. and Ghosh, S. K. (2016). Effect of egg yolk powder on freezability of murrah buffalo (*Bubalus Bubalis*) semen. *Veterinary World*. 9 (6), 601-604.
- Küçükkebabçı, M. ve Aslan, S. (2002). Evcil dişi mandaların üreme özellikleri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 42 (2), 55-63.
- Lambrechts, H. Van Niekerk, F. E. Coetzer, W. A. Cloete, S. W. P. and Van Der Horst, G. (1999). The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal african buffalo (*Svncerus caffer*) spermatozoa. *Theriogenology*. 52, 1241-1249.
- Lei, C. Z. Zhang, W. Chen, H. Lu, F. Liu, R. Y. Yang, X. Y. Zhang, H. C. Liu, Z. G. Yao, L. B. Lu, Z. F. and Zhao, Z. L. (2007). Independent maternal origin of chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 38, 97–102.
- Lessard, C. Danielson, J. Rajapaksha, K., Adams, G. P. and McCorkell, R. (2009). Banking North American buffalo semen. *Theriogenology*. 71, 1112–1119.
- Lovelock, J. E. (1957). The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proceedings The Royal Society B*. 147, 427-433.
- Martinez-Pastor F., Guerra, C., Kaabi, M., Diaz, A. R., Anel, E., Herraez, P., Paz, P. and Anel, L. (2005). Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology*. 63, 24-40.
- Mazur, P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of General Physiology*. 47, 347-369.
- McCool, C. J. and Entwistle, K. W. (1989). Reproductive function in the Australian swamp buffalo bull: age effects and seasonal effects. *Theriogenology*. Vol: 31-3, 583-594.
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D. and Rodrigues, J. L. (2002). Current status of spermcryopreservation. Why is it better? *Theriogenology*. 57, 327–344.
- Morris, G. J. and Clarke, A. G. (1987). Cells at low temperatures. In: Grout BWW, Morris GJ, editors. *The Effects of Low Temperatures on Biological Systems*. Edward Arnold, London. 72–119.
- Nair, S. J. Brar, A.S. Ahuja, C.S. Sangha, S. P. S. and Chaudhary, K. C. (2006). A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Animal Reproduction Science*. 96, 21–29.
- Parks, J. E. (1997). Hypothermia and mammalian gametes. In: Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive Tissue Banking*. San Diego, Academic Press. 229-261.
- Patrizio, P., Silber, S., Ord, T., Balmaceda, J. P. and Asch, R. H. (1988). Two births after microsurgical sperm aspiration in congenital absence of vas deferens. *Lancet*. 2, 1364.
- Perera, B. M. A. O. (1999). Reproduction in water buffalo: Comparative aspects and implications for management. *Journal Reproduction and Fertility Supplements*. 54, 157–168.

- Perera, B. M. A. O. (2008). Reproduction in domestic buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (Suppl. 2), 200–206.
- Presice, G.A. (2007). Reproduction in the water buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*. 42, 24-32.
- Qamar, A. Y., Sattar, A. and Ahmad, N. (2013). Cholesterol enhances post-thaw semen quality in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Buffalo Bulletin*. Vol.32 (Special Issue 2), 370-374
- Rasul, Z., Ahmed, N. and Anzar, M. (2007). Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology*. 68, 813-819
- Rajoriya, J. S., Prasad, J. K., Ramteke, S. S., Perumal, P., Ghosh, S. K. Singh, M., Pande, M. and Srivastava, N. (2016). Enriching membrane cholesterol improves stability and cryosurvival of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. Vol.164, 72-81.
- Rehman, Z. U., Samo, M. U., Qureshi, T. A., Khan, S., Qureshi, M. S., Khan, F. A. and Bahadadr, S. (2012). Studies on the freezability of kundhi buffalo bull semen. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 22 (2), 18-23.
- Resmi Gazete. (2004). Yerli Hayvan Irk ve Hatlarının Tescili Hakkındaki Tebliğ. Tebliğ No: 2004/39
- Rizal, M., Herdis, Yulnawati and Maheshwari, H. (2007). The quality enhancement of epididymal spermatozoa of spotted buffalo cryopreserving with various sucrose concentrations. *Journal Veteriner*. Vol. 8 (4), 188-193.
- Salamon, S. and Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62, 77–111.
- Sansone, G. Natri, M. J. F. and Fabbrocini, A. (2000). Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*. 62, 55–76.
- Sarıözkan, S. (2011). Türkiye’de manda yetiştiriciliğinin önemi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 17 (1), 163-166.
- Sarıözkan, S. Bucak, M. N. Tuncer, P.B. Büyükleblebici, S. Eken, A. and Akay, C. (2015). Influence of fetuin and hyaluronan on the postthaw quality and fertilizing ability of holstein bull semen. *Cryobiology*. 71 (1), 119-124.
- Saurabh, Srivastava S., Sharma, P. and Gautam, V. (2018). Effect of ascorbic acid on preservability of spermatozoa of buffalo bull after storage of epididymis at temperature 4 °C and -196 °C. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 6 (3), 1065-1070.
- Selçuk, M. ve Akal, E. (2015). Testicular morphology and in vitro evaluation of frozen epididymal sperm of Anatolian buffalo. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 62, 51-55.
- Shah, S. A. H., Andrabi, S. M. H. and Qureshi, I. Z. (2016). Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrology*. 4, 972-976
- Shahverdi, A., Rastegarnia, A. and Topraggaleh, T. R. (2014). Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*Bubalus Bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal (Yakhteh)*. 16 (3), 279-288.
- Sharma, A. K. and Gupta, R. C. (1978). Epididymal sperm reserve in buffalo-bulls (*Bubalus Bubalis*). *Andrologia*. 10 (6), 479-483.
- Siddique, M., Ali, R. and Raza, A. (2006). Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *Journal of Agriculture & Social Sciences*. 2 (2), 117-119.

- Singh, L.P. Hiron, M. H. and Ansari, M. R. (2007). Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 99, 395–400.
- Soysal, M.İ., Kök, S ve Gürcan, E.K. (2005). Mandalarda alyuvar polimorfizmi üzerine bir araştırma. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*. 2 (2), 189-193
- Soysal, İ. (2009). Manda ve ürünleri üretimi. *Tekirdağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Ders Notları*. Tekirdağ.
- Soysal, M. İ. (2013). Anatolian water buffaloes husbandry in turkey. *Buffalo Bulletin* Vol.32. (Special Issue 1), 293-309.
- Sukhato, P. Thongsodseang, S. Utha, A. and Songsasen, N. (2001). Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 67, 69–77.
- Tekin, N. (1994). Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. Alaçam E, editor. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun"i Tohumlama, *Doğum ve Infertilite*. Dizgievi. Konya. 67-79.
- Tuli, R. K., Singh, M. and Matharoo, J. S. (1981). Effect of different equilibration times and extenders on deep freezing of buffalo semen. *Theriogenology*. 16 (1), 99-104.
- Tuli, R. K. and Singh, M. (1983). Seasonal variation in freezability of buffalo semen. *Theriogenology*. Vol: 20-3, 321-324.
- Turner, T. T. and Reich, G. W. (1985). Cauda epididymal sperm motility: A comparison among five species. *Biology of Reproduction*. 32, 120-128.
- TÜİK, (2020). <http://www.tuik.gov.tr/Start.do>.
- Vale, W. G. (1994). Collection, Processing and deep freezing of buffalo semen of buffalo semen. *Buffalo of Journal*. 65–72.
- Valete, P. J. E., Maylem, S. R. E., Ocampo, B. M., Abella, A. E. and Ocampo, C. L. (2015). Post mortem viability of epididymal sperm from philippine native water buffalo (Bubalus bubalis). *Journal of Agricultural Technology*. Vol.11 (8), 2283-2294
- Van Den Berg, J. C. T. (1990). Strategy for dairy development in the tropics and subtropics. Wageningen, Netherlands, *Centre For Agricultural Publishing and Documentation* (Pudoc).
- Van Leeuwen, M. M. (2020). The effect of processing on the short- and long- term viability of epididymal african buffalo (Syncerus Caffer) spermatozoa. Thesis. *Stellenbosch University*. South Africa.
- Waheed, S. Ahmad, N. Rahman, N. Rahman, H. J. Younis, M. and Iqbal, S. (2012). Evaluation of duck egg yolk for the cryopreservation of nili-ravi buffalo bull semen. *Animal Reproduction Science*. 131, 95–99.
- Whittier, J. (2016). Reproductive anatomy and physiology of the bull. Extension2.missouri.edu. Erişim: 2 Kasım 2020, <https://extension2.missouri.edu/q2016>.
- Vilela, C. G. Marquez, J. M., Graham, J. K. and Barfield, J. P. (2017). Cryopreservation of bison epididymal sperm: A strategy for improving post-thaw quality when collecting sperm in field conditions. *Theriogenology* 89, 155-161.
- Yeni, D. ve Avdatek, F. (2017). Kısa süreli saklanan epididimal anadolu mandası spermasına ilave edilen karnosik asitin etkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*. 10 (3), 187-195.

- Yıldız, C., Kaya, A., Aksoy, M. ve Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 54 (4), 579-585.
- Yulnawati, Gunawan, M., Maheshwari, H., Rizal, M., Herdis and Boediono, A. (2010). Quality of epididymal and ejaculated sperms of spotted buffalo in dextrose supplemented extender. *Hayati Journal of Biosciences*. 17 (1), 27-30.
- Yulnawati, Y., Maheshwari, H., Rizal, M., and Boediono, A. (2013). Frozen-Thawed epididymal sperm quality and the success rate of artificial insemination in spotted buffaloes (*Bubalus bubalis carabanensis*). *Buffalo Bulletin*. Vol.32 (Special Issue 2), 494-497
- Zhou, J., Chen, L., Li, J., Li, H., Hong, Z. and Xie, M. (2015). The semen pH affects sperm motility and capacitation. *PLoS ONE*. 10(7), e0132974.

