



doi: 10.33188/ vetheder.1082675

Araştırma Makalesi/ Research Article

## Epididimal manda spermasının dondurulmasında spermaya katılan farklı sulandırıcıların spermatolojik parametreler üzerine etkisinin in-vitro değerlendirilmesi

Emre DEMİRCİ<sup>1,a\*</sup>, Murat SELÇUK<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup> Küre Tarım ve Orman İlçe Müdürlüğü, Küre, Kastamonu

<sup>2</sup> Ondokuzmayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Samsun

ORCID: 0000-0002-3558-1760<sup>a</sup>, 0000-0003-1371-6297<sup>b</sup>

### MAKALE BİLGİSİ/

### ARTICLE INFORMATION

### Geliş / Received:

4 Mart 22

4 March 22

### Revizyon/Revised:

15 Haziran 22

15 June 22

### Kabul / Accepted:

20 Temmuz 22

20 July 22

### Anahtar Sözcükler:

Dondurma,  
Epididimal,  
Manda,  
Sperma,  
Sulandırıcı.

### Keywords:

Buffalo,  
Epididymal,  
Extender,  
Freezing,  
Sperm

### ÖZET:

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. Mezbahanelerden kesim sonrası alınan 15 adet erkek Anadolu mandası (3 yaş ve üzeri) testislerinden elde edilen epididimal spermalara 6 farklı sperma sulandırıcısı (Tris, OptixCell®, BioXcell®, BullXcell®, AndroMed®, Steridly®) katılarak yapılan spermatolojik muayenelerle spermatozoonların motilitesi, ölü/canlı spermatozoon oranı, anormal spermatozoon oranı ve Hipo Osmotik Şişme Testi (HOST) oranları saptandı. Araştırmada taze sperma ile çözüm sonu sperma motilitesi, ölü spermatozoon oranı, HOST oranı, orta kısım, kuyruk ve toplam anormal spermatozoa oranları arasında önemli ( $p < 0,001$ ) farklılıkların olduğu saptandı. Sulandırıcılar arasında motilite oranı taze spermada Tris ( $55 \pm 2,71$ ), çözündürme sonrasında ise Tris ve OptixCell® (% 6) diğer sulandırıcılara göre daha iyi sonuçlar verdi. Ölü spermatozoon oranında da Tris sulandırıcısı, taze ve çözündürme sonrasında sırasıyla  $22 \pm 0,98$  ve  $65,30 \pm 2,94$  ile diğer sulandırıcılara göre en iyi sonucu verdi. Anormal spermatozoonda ise en az toplam anormali veren sulandırıcı taze ve dondurma çözündürme sonrası sırasıyla  $18,06 \pm 0,56$  ve  $18,60 \pm 0,72$  sonuçlarını veren BullXcell® 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 ( $P \geq 0,05$ ). 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 motilite oranları yapılan çalışmalarla uyumlu bulundu. Sonuç olarak post-mortem elde edilen epididimal manda spermasının biyoteknolojik yöntemler kullanılarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

### *In-vitro evaluation of the effects of different extenders on spermatological parameters in the freezing of epididymal buffalo sperm*

### ABSTRACT:

The aim of this study is to examine the effect of freezing on some spermatological parameters by using various semen extenders in epididymal semen obtained from buffalo testicles taken from slaughterhouses after slaughter. Six different semen extenders (Tris, OptixCell®, BioXcell®, BullXcell®, AndroMed®, Steridly®) were added to the epididymal semen obtained from 15 male Anatolian buffalo testicles taken from slaughterhouses after slaughter and evaluated by performing spermatological examinations. In the study, it was determined that there were significant ( $p < 0,001$ ) differences between fresh semen and semen at solution semen motility, rate of dead spermatozoa, HOST rate, and total abnormal spermatozoa rates. Among the extenders, the motility ratio of Tris was better in fresh semen, and after thawing, Tris and OptixCell® gave better results than the other extenders. In terms of dead spermatozoa, Tris extender gave the best results compared to other extenders with  $22 \pm 0.98\%$  and  $65.30 \pm 2.94\%$ , respectively, after fresh and thawing. In abnormal spermatozoa, the extender that gave the least total abnormality was the BullXcell® extender, which gave the results of  $18.06 \pm 0.56\%$  and  $18.60 \pm 0.72\%$  after freezing and thawing, respectively. Considering the HOST ratios, Tris extender ( $63.40 \pm 0.78\%$ ) gave the best result in fresh semen, while no significant difference was observed between the extenders after freezing and thawing ( $P > 0.05$ ). Considering these parameters in our study, it is seen that the Tris extender is the semen extender that gives the best results. As a result, it is thought that epididymal buffalo semen obtained post-mortem can be evaluated using biotechnological methods.

**How to cite this article:** Demirci E, Selcuk M. In-vitro evaluation of the effects of different extenders on spermatological parameters in the freezing of epididymal buffalo sperm. Vet Hekim Der Derg 2023; 94(1):1-10. DOI: 10.33188/ vetheder.1082675

## 1. Giriş

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 ve yetiştirme giderlerinin düşük olması nedeniyle tercih edilmektedir. Bunların yanı sıra her türlü iklim koşullarına uyum sağlayabilmesi ve alınan hayvansal ürünleri bileşenlerinin diğer türlere göre daha aranan özellikte olmasından dolayı yetiştiriciler açısından önemi çok fazladır (1).

Spermanın sulandırılması ve kriyoprezervasyonu erkek hayvana bakma zorunluluğu olmaksızın, genetiğinin popülasyonlar arasında kullanımını kolaylaştırır. Cinsel yolla bulaşan hastalıkların bulaşması önlenir. Kesim ve ölüm gibi nedenlerle çiftleşmede kullanılamayacak erkek hayvanların genetiğinin aktarılmasını sağlar (2). Spermanın dondurulmasında çok sayıda ticari sulandırıcı hazırlanmış ve çoğunlukla boğa sperması üzerinde birçok araştırma yapılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Manda spermasının membranında fosfolipit içeriğinin düşük seviyede olması ve dondurma-çözdürme işlemleri esnasında bu yapının kayba uğraması, manda spermasının dondurulabilme kapasitesini düşürdüğü yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (3).

Manda spermasındaki spermatozoonların soğutma sıcaklığında (+4 °C) antioksidan enzimlerin faaliyetlerinin daha az olması nedeniyle, daha yüksek lipid peroksidasyonuna maruz kaldığı bildirilmiş bu da manda spermatozoonlarının soğutma sıcaklığında (+4 °C) saklandığında sığır spermatozoonlarına kıyasla oksidatif strese daha yatkın olduklarını göstermiştir (4).

Mandalardan elde edilen epididimal spermaya sperma sulandırıcısı eklendikten sonra 2-5 dakika içerisinde motil yeteneği kazandığı saptanmıştır (5). Yapılan çalışmalarda elde edilen epididimal manda spermaları kesim sonrası doku dejenerasyonunun zararlı etkilerini en aza indirmek için en kısa sürede (30 dk-4 sa) laboratuvara getirilerek, sulandırma işlemine hazır hale getirilmiştir (6). Epididimal manda spermasında sulandırıcı olarak ticari olarak temin edilebilen sulandırıcılar kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada Amerikan bufalolarından alınan epididimal spermatozoonlar 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 edilememiştir (7). Epididimal manda spermasında yapılan bir başka çalışmada ise epididimal manda spermatozoonları Andromed ve Triladyl sulandırıcıları ile sulandırılmış ve çözüm sonu progresif motiliteleri sırasıyla % 13 ve % 18 olarak tespit etmişlerdir (8). 2009 yılında yapılan başka bir 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 (18). Epididimal manda spermasının sulandırmasında sulandırıcı olarak daha çok laboratuvarında hazırlanan Tris-Sitrik Asit-Yumurta Sarısı sulandırıcısı kullanılmaktadır (10,11).

Çalışmamızda, Anadolu manda boğalarından elde edilecek epididimal spermalara katılacak olan sulandırıcıların dondurma çözdürme sonrası in-vitro değerlendirmeleri yapılarak en iyi sonuçlara sahip sperma sulandırıcısının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Gereç ve Yöntem

Mezbahaneye getirilen sağlıklı ve gelişimini tamamlamış 3 yaş ve üzerinde olan yaklaşık 200'e yakın erkek manda incelendi. Kesim öncesi muayenesi Veteriner Hekim'ler tarafından yapılan ve kesimine onay verilen 15 adet sağlıklı erkek Anadolu Mandasından alınan testisler çalışmanın materyal bölümünü oluşturdu.

### Epididimal spermanın elde edilmesi

Kesim için mezbahaya gelen mandaların testisleri Lambrechts ve ark. (6)'da belirtildiği gibi, kesimin hemen ardından scrotumları bir bıçak ile kesilerek açığa çıkarılmasından sonra spermatik kord'tan epididimislerle beraber kesilerek uzaklaştırıldı. Epididimisler soğutulmanın hızlanması amacıyla testislerden kesilerek uzaklaştırıldı. Epididimisler daha öncesinden + 4 °C'yi sağlayacak şekilde buz kalıpları ile soğutulan kapalı bir termosu buz kalıplarına temas ettirilmeden konularak vakit geçirmeksizin en kısa sürede (en geç 30 dk) laboratuvara getirildi. Laboratuvara getirilen epididimisler buzdolabında işlenmek üzere bekletildi. Laboratuvara getirilen epididimislerin bütün işlemleri en geç 4 saat içerisinde tamamlandı (6).

Testislerden ayrılmış olan epididimisler steril bir bistüri yardımıyla cauda epididymis bölgesi üzerine kesitler atılarak kanallarda bulunan spermanın dışarı çıkması sağlandı. Dışarı çıkan sperma herhangi bir solüsyon kullanılmadan steril bir enjektör yardımıyla çekilerek elde edildi (12). Elde edilen her epididimal sperma deneme grupları için 6 ayrı parçaya bölünerek mix yapılmadan sulandırılma işlemine geçildi.

### **Spermanın sulandırılması**

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

1. TRİS (3,028 gr Tris, 1,675 gr sitrik asit, 1,25 gr früktoz, %7 gliserol ve %20 yumurta sarısı) sulandırıcısı
2. OptixCell® (sentezlenmiş lipozomlara dayanan hayvansal protein içermeyen) sulandırıcısı
3. BioXcell® (Bitkisel protein bazlı hayvansal protein içermeyen) sulandırıcısı
4. BullXcell® (Yumurta sarısı eklenmesi için özel hazırlanmış özel preparat) sulandırıcısı
5. AndroMed® (Fosfolipidler, TRIS, sitrik asit, şeker, antioksidan, tampon, gliserol ve saf su içeren hayvansal kökenli içerik içermeyen) sulandırıcısı

6. Steridly® (TRIS, sitrik asit, şeker, tampon, gliserol, saf su ve ışınlanmış steril yumurta sarısı içeren) sulandırıcısı ile sulandırıldı.

### **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 °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 (3). Son olarak -196 °C'deki sıvı azot içerisine daldırılıp, çözdürme işlemine kadar sıvı azot tankı içerisinde saklandı. Dondurulan payetler incelenmek üzere sıvı azot tankından alınarak 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 saniye süreyle tutularak çözdürüldü ve ardından payetlerden çıkarılan spermalar, spermatolojik parametreler yönünden incelendi (13).

### **Çalışma grupları spermatolojik muayeneleri**

Elde edilen spermalar spermatolojik parametreler yönünden taze, equilibasyon sonrası ve çözdürme sonrası zamanlarda incelendi. Spermatolojik parametrelerden motilite (%) Sharma (33)'ya göre, spermatozoon yoğunluğu ( $\times 10^6$  sp/ml), ölü/canlı spermatozoon oranı (%), anormal spermatozoon oranı (%) Tekin (14)'e göre, Hipo-ozmotik şişme testi (HOST) oranı da Sarıözkan ve ark. (15)'daki yöntemle göre tespit edildi.

### **Motilite muayenesi**

Muayene ısıtma tablalı, faz-kontrast mikroskop kullanılarak yapıldı ve oranı yüzde (%) olarak belirlendi. Sulandırılan ve dondurulup çözdürülen spermadan küçük bir damla alınarak ısıtma tablalı ve ısısı 37 °C'ye ayarlanmış mikroskopta lam üzerine konulup, lamel ile kapatılarak 40× 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 (33).

### **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 (14).

### **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 (14).

### 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/lit'lik bir solüsyon (9 gr fruktoz ile 4,9 gr sodyum sitratın 1 litre distile su içerisinde çözülmesi 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 (15).

### 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, dengeleme sonrası ve dondurma çözme sonrası) motilite oranı, ölü spermatozoon oranı, anormal spermatozoon (baş, orta kısım, kuyruk ve toplam) oranı ve hipo-ozmotik şişme testi (HOST) oranlarının etkilerini ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilmesi için GENMOD (Genelleştirilmiş Doğrusal Modeller) istatistik yönteminde logaritmik bağlantı fonksiyonunun 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.

### 3. Bulgular

Spermatolojik parametrelerden motilite bulgularını karşılaştırdığımızda taze spermada en iyi sonuçların Tris sulandırıcısından ( $55,00 \pm 2,71$ ) elde edildiği, Andromed® ve BioXcell® sulandırıcılarının ise diğer sulandırıcılara göre önemli derece kötü sonuçlar verdiği ( $P < 0,001$ ) belirlendi. Çözme sonrasında alınan bulgularda ise OptixCell® ve Tris sulandırıcıları ile sulandırılan spermaların diğer sulandırıcılara oranla farkları önemli bulundu ( $P < 0,001$ ). Sulandırıcıların motilite bulguları Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1:** Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların taze, dengeleme sonrası ve çözme sonrası motilite bulguları

**Table 1:** Percent of individual progressive motility of sperm diluted with different extenders, fresh, equilibration and after thawing

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibrasyon Sonrası	Çözme Sonrası	P
Andromed®	$12,66 \pm 1,07^{d,x}$	$0^{d,y}$	$0^{b,y}$	$<0,001$
BioXcell®	$14,00 \pm 1,30^{d,x}$	$1,33 \pm 0,9^{d,y}$	$1,00 \pm 0,72^{b,y}$	$<0,001$
BullXcell®	$36,66 \pm 4,64^{c,x}$	$18,30 \pm 3,89^{c,y}$	$2,66 \pm 1,07^{b,z}$	$<0,001$
OptixCell®	$47,00 \pm 3,86^{a,b,x}$	$29,00 \pm 3,20^{b,y}$	$6,00 \pm 1,48^{a,z}$	$<0,001$
Steridly®	$40,00 \pm 3,04^{c,b,x}$	$19,66 \pm 1,98^{c,y}$	$2,33 \pm 1,36^{b,z}$	$<0,001$
Tris	$55,00 \pm 2,71^{a,x}$	$36,33 \pm 1,50^{a,y}$	$6,00 \pm 1,00^{a,z}$	$<0,001$
P	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	

\*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. Çözdürme 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 2.'de verilmiştir.

**Tablo 2:** Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların taze, equilibrasyon sonrası ve çözdürme sonrası ölü spermatozoon oranları

**Table 2:** Fresh, equilibration and after thawing dead spermatozoon rates of sperm diluted with different extenders

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibrasyon sonrası	Çözdürme Sonrası	P
AndroMed®	43,80 ± 0,87 <sup>a,x</sup>	66,93 ± 0,89 <sup>a,y</sup>	83,46 ± 1,01 <sup>a,z</sup>	<0,001
BioXcell®	42,40 ± 1,07 <sup>a,x</sup>	63,13 ± 1,82 <sup>a,y</sup>	78,20 ± 1,71 <sup>a,z</sup>	<0,001
BullXcell®	30,73 ± 2,22 <sup>b,x</sup>	44,26 ± 3,36 <sup>b,y</sup>	71,53 ± 2,02 <sup>b,z</sup>	<0,001
OptixCell®	25,93 ± 1,68 <sup>d,c,x</sup>	35,53 ± 2,25 <sup>d,c,y</sup>	70,00 ± 2,74 <sup>b,z</sup>	<0,001
Steridly®	28,73 ± 1,49 <sup>b,c,x</sup>	39,26 ± 1,38 <sup>b,c,y</sup>	71,66 ± 2,45 <sup>b,z</sup>	<0,001
Tris	22,00 ± 0,98 <sup>d,x</sup>	31,13 ± 1,06 <sup>d,y</sup>	65,30 ± 2,94 <sup>b,z</sup>	<0,001
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,001	

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

Toplam anormal oranlarında ise yine üç zamanda da (Taze sperma, equilibrasyon sonrası ve çözdürme sonrası) BioXcell® ve Steridly® sulandırıcılarının diğer sulandırıcılara göre önemli farklılıkları olduğu belirlendi ( $P<,0001$ ). Bütün sulandırıcıların taze ile çözdürme sonrası bulgularında anlamlı derecede fark gözlemlendi. Sulandırıcıların üç zamandaki toplam anormal oranları Tablo 3.'te verilmiştir.

**Tablo 3:** Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların taze, equilibrasyon sonrası ve çözdürme sonrası toplam anormal spermatozoon oranları

**Table 3:** Total abnormal spermatozoa ratios of sperm diluted with different extenders, fresh, equilibration and after thawing

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibrasyon Sonrası	Çözdürme Sonrası
AndroMed®	20,93 ± 0,46 <sup>b</sup>	21,20 ± 0,57 <sup>b</sup>	21,46 ± 0,63 <sup>c,d</sup>
BioXcell®	29,86 ± 0,85 <sup>a</sup>	32,46 ± 1,02 <sup>a</sup>	36,86 ± 0,70 <sup>a</sup>
BullXcell®	18,06 ± 0,56 <sup>c</sup>	18,60 ± 0,63 <sup>c</sup>	18,60 ± 0,72 <sup>c</sup>
OptixCell®	21,53 ± 0,52 <sup>b</sup>	21,53 ± 0,63 <sup>b</sup>	22,80 ± 0,51 <sup>c</sup>
Steridly®	28,86 ± 1,16 <sup>a</sup>	32,86 ± 0,94 <sup>a</sup>	32,33 ± 0,90 <sup>b</sup>
Tris	18,40 ± 0,69 <sup>c</sup>	18,40 ± 0,74 <sup>c</sup>	20,00 ± 0,56 <sup>d,e</sup>
<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 equilibrasyon sonrasında AndroMed® ve BioXcell® sulandırıcılarının diğer sulandırıcılara kıyasla önemli bir fark tespit edildi ( $P < 0,001$ ). Çözdürme sonrasında ise sulandırıcılar arasında önemli bir fark tespit edilmedi ( $P > 0,05$ ). Sulandırıcıların üç zamandaki hipo-osmotik şişme testi oranları Tablo 4.'te verilmiştir.

**Tablo 4:** Farklı sulandırıcılar ile sulandırılan spermaların taze, equilibrasyon sonrası ve çözdürme sonrası host bulguları  
*Table 4: HOST findings of sperm diluted with different extenders, fresh, equilibration and after thawing*

Sulandırıcılar	Taze Sperma	Equilibrasyon sonrası	Çözdürme Sonrası	P
AndroMed®	22,53 ± 0,93 <sup>d,x</sup>	19,00 ± 0,83 <sup>d,y</sup>	7,20 ± 0,65 <sup>a,z</sup>	<0,001
BioXcell®	22,60 ± 1,14 <sup>d,x</sup>	18,66 ± 0,97 <sup>d,y</sup>	8,46 ± 0,81 <sup>b,a,z</sup>	<0,001
BullXcell®	42,26 ± 0,55 <sup>c,x</sup>	25,70 ± 0,55 <sup>c,y</sup>	9,46 ± 0,99 <sup>b,a,z</sup>	<0,001
OptixCell®	51,40 ± 1,03 <sup>b,x</sup>	35,80 ± 0,78 <sup>b,y</sup>	10,86 ± 1,10 <sup>b,z</sup>	<0,001
Steridly®	44,40 ± 0,45 <sup>c,x</sup>	24,20 ± 0,39 <sup>c,y</sup>	11,13 ± 0,82 <sup>b,z</sup>	<0,001
Tris	63,40 ± 0,78 <sup>a,x</sup>	42,66 ± 0,83 <sup>a,y</sup>	8,66 ± 0,96 <sup>b,a,z</sup>	<0,001
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.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Yapılan çalışmalarda mezbahada kesilen erkek mandalardan alınan testislerin 30 dakika ile 4 saat içerisinde işlenmiş olduğu gözlenmiştir (6,8). Barati ve ark. (18), 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 ve ark. (19), 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 motiliteye sahip olduğunu bildirmişler ve bu işlemde en önemli bölümün yavaş soğutma ile equilibrasyon olduğunu belirtmişlerdir. Herold ve ark. (20), 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 ve ark. (21), 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 (6,22). 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.

Abdel-Aziz Swelum ve ark. (31) ejakule deve spermalarında yapmış oldukları çalışmalarında Andromed, Optixcell ve Steridly sulandırıcıları ile sulandırılan spermalarda çözüm sonu progresif motilite sonuçlarını sırasıyla % 3, % 3 ve % 5 olarak tespit etmişlerdir. Al-Essawe ve ark. (32) alpakalarda yapmış oldukları çalışmada epididimal alpaka spermasına katılan Andromed sulandırıcısıyla 10 dakikalık inkubasyon sonrası progresif motiliteyi % 10 olarak bildirmişlerdir. Sperma sulandırıcıları ticari olarak genelde sığırlar için hazırlanmaktadır. Sığırlara benzer ancak farklı

hayvan türleri üzerine yapılan çalışmalarda inkubasyon ya da çözüm sonunda progresif motilite sonuçları istenilen düzeylere ulaşamamıştır.

Çalışmada motilite sonuçları sulandırıcılar kendi arasında karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklı sonuçlar ( $P<0,001$ ) 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 ve ark. (7), 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 ve ark. (8), epididimal manda spermalarında yaptıkları çalışmada epididimal manda spermatozoalarını AndroMed ve Triladyl sulandırıcıları ile sulandırmış ve çözüm sonu progresif motilite oranlarını sırasıyla % 13 ve % 18 olarak bildirmişlerdir. Herold ve ark. (23), yaptıkları benzer bir çalışmada da AndroMed ve Triladyl sulandırıcıları ile spermatozoalarını sulandırmış ve çözüm sonu progresif motilite oranlarını benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Barati ve ark. (18), 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 (9), yayınlanmış olduğu çalışmasında epididimal manda spermasını BioXcell sulandırıcısı ile sulandırmış progresif motiliteyi taze spermada %50 dondurulmuş çözdürülmüş spermada % 27,50 olarak bulmuştur. Camargos ve ark. (24)'te 18 aylık erkek Murrah mandasının epididimisi 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 ve ark. (25), epididimal manda spermasının sulandırılmasında AndroMed sulandırıcısına belli oranlarda ilave edilen sükrözün sperma kalitesine etkisini araştırmış, ticari bir preparat olan AndroMed sulandırıcısına sükröz eklenmesinin çözülmeden sonra epididimal manda spermasının kalitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Vilela ve ark. (19), yapmış oldukları çalışmada bison epididimal spermasında progresif motiliteyi dondurma öncesinde % 73 dondurma çözdürme sonrasında da % 21 olarak tespit etmişlerdir. Singh ve ark. (26), 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 equilibasyon sonrası değerlerin bildirildiği çalışmalara rastlanılmamıştır.

Mandalarda epididimal spermaların ölü spermatozoon oranlarının araştırıldığı çalışmalarda birçok bilgiler elde edilmiştir. Lambrechts ve ark. (6), 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 ve ark. (27), çalışmalarında ölü spermatozoa oranını dondurma öncesi spermada % 17,67, dondurma çözdürme 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 (26). Hiron ve ark. (17), epididimal manda spermasında yapmış oldukları çalışmalarında dondurma öncesi ölü spermatozoa oranını % 16,08, dondurma çözdürme sonrası ölü spermatozoa oranını ise % 31,33 olarak tespit etmişlerdir. Akal (9) 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 spermatozoon oranlarına baktığımızda hem taze hemde çözdürme sonrasında Tris ve OptixCell sulandırıcılarının en düşük oranları verdiği gözlemlendi. Sulandırıcılar arasında en yüksek ölü spermatozoon oranlarını da AndroMed sulandırıcısından elde edildiği tespit edildi. Yaptığımız araştırmamızda mandaların epididimal spermalarının ölü spermatozoon oranı yapılan diğer çalışmalara göre yüksek bulunmuştur. Elde ettiğimiz ölü spermatozoon oranlarının diğer çalışmalardaki oranlara göre yüksek olması, elde edilen düşük motilite değerlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Epididimal manda spermalarının spermatolojik muayanelerinde anormal spermatozoon oranlarını inceleyen çeşitli yayınlar vardır. Akal (9), 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 da % 32,06 ve % 42,90 olarak bildirmiştir. Lambrechts ve ark. (6), 1995 ve 1996 yıllarında epididimal manda spermasında yapmış olduğu çalışmada toplam anormal oranlarını sırasıyla % 31,3 ve % 24,7 olarak tespit etmiştir. Yulnawati ve ark. (16), 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 (28) yapmış oldukları çalışmada baş anormalini taze ve dondurulmuş çözdürülmüş 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 ve ark. (29), yapmış oldukları çalışmalarında epididimal manda sperma sulandırıcısına % 20 serum ilavesinin anormal spermatozoa oranını % 23,5'ten % 14,20'ye düşürdüğünü bildirmişlerdir. Yeni ve Avdatek (30) 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 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 sulandırıcısında tespit edildi. Yaptığımız araştırmada elde ettiğimiz anormal bulguları ile yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında genel itibariyle uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda spermatozoonların membran bütünlüğü HOST testi yapılarak ölçülmüştür. Yulnawati ve ark. (16), 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 sonrası ise sırasıyla % 47,33 ve % 67,33 olarak tespit etmişlerdir. Singh ve ark. (26), 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 (27). 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 (22). Yapılan çalışmalarda ki sonuçlar araştırmamızdaki elde ettiğimiz sonuçlara nazaran daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni olarak çalışmamızdaki düşük motilite değerleri ve yüksek ölü spermatozoon oranı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan sperma sulandırıcıları arasında spermatolojik parametreler değerlendirildiğinde istatistiki olarak Tris sulandırıcısının hem taze hem de çözdürülmüş spermada en iyi sonuçlara sahip sperma sulandırıcısı olduğu söylenebilir. Ancak çalışmamız sonucunda elde edilen çözüm sonu spermatolojik değerler gözönüne alındığında (ileri biyoteknolojik yöntemlerde bile kısıtlı bir kullanım sağlayacağından) herhangi bir sebeple kesime gidecek ve gen kaynağı olarak kullanılmak istenen epididimal manda spermaları için özel olarak hazırlanacak sperma sulandırıcılarına ve bu konuda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

### **Çıkar Çatışması Beyanı**

Makalenin yazarlarının çalışma kapsamında herhangi bir kişisel ve finansal çıkar çatışması bulunmamaktadır.

### **Finansal Kaynak Beyanı**

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.



### Yazar Katkısı Beyanı

Fikir/kavram: Emre DEMİRCİ, Murat SELÇUK  
 Deney tasarımı: Emre DEMİRCİ, Murat SELÇUK  
 Denetleme/Danışmanlık: Murat SELÇUK  
 Veri toplama: Emre DEMİRCİ  
 Veri analizi ve yorum: Emre DEMİRCİ, Murat SELÇUK  
 Kaynak taraması: Emre DEMİRCİ  
 Makalenin yazımı: Emre DEMİRCİ

### Etik Onay

Bu makaledeki sunulan verilerin, bilgilerin ve dokümanların akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edildiği, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçlarının bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunulduğuna dair yazarlardan etik beyan alınmıştır.

### Kaynaklar

1. Dellal G. Dişi mandalarda üreme. Hayvancılık Araştırma Dergisi 1994;4 (1): 55-56.
2. Philpott M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. Br Vet J 1993;149:339-69.
3. Sansone G, Nastri MJF and Fabbrocini A. Storage of buffalo (bubalus bubalis) semen. Animal Reproduction Science 2000; 62: 55-76.
4. Nair SJ, Brar AS, Ahuja CS, Sangha SPS and Chaudhary KC. 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. 2006; 96: 21-29.
5. Acott TS and Carr DW. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. Biology of Reproduction 1984; 30, 926-935.
6. Lambrechts H, Van Niekerk FE, Coetzer WA, Cloete SWP and Van Der Horst G. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal african buffalo (syncerus caffer) spermatozoa. Theriogenology. 1999; 52: 1241-1249.
7. Lessard C, Danielson J, Rajapaksha K, Adams GP and Mc Corkell R. Banking North american buffalo semen. Theriogenology 2009; 71: 1112-1119.
8. Herold FC, Aurichb JE and Gerber D. Epididymal sperm from the african buffalo (syncerus caffer) can be frozen successfully with AndroMed® and with Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. Theriogenology 2004; 61: 715-724.
9. Akal E. 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. 2014.
10. Siddique M, Ali R and Raza A. Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. Journal of Agriculture & Social Sciences 2006; 2(2): 117-119.
11. Saurabh Srivastava S, Sharma P and Gautam V. Effect of ascorbic acid on preservability of spermazotoza of buffalo bull after storage of epididymis at temperature 4 °C and -196 °C. Journal of Entomology and Zoology Studies 2018; 6(3): 1065-1070.
12. Patrizio P, Silber S, Ord T, Balmaceda JP and Asch RH. Two births after microsurgical sperm aspiration in congenital absence of vas deferens. Lancet 1998; 2: 1364.
13. Dudeja S. Effect of Temperature of thawing and diluent on the post-thaw physiological changes of buffalo frozen semen. Indian J Physiol Pharmacol 1990; 34 (4): 267-270.
14. Tekin N. Spermmanın muayenesi ve değerlendirilmesi. Alaçam E, editor. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve Infertilite. Dizgievi, Konya. 1994; 67-79.
15. Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Eken A and Akay C. Influence of fetuin and hyaluronan

- on the postthaw quality and fertilizing ability of holstein bull semen. *Cryobiology* 2015; 71 (1): 119-124.
16. Yulnawati, Gunawan M, Maheshwari H, Rizal M, Herdis and Boediono A. Quality of epididymal and ejaculated sperms of spotted buffalo in dextrose supplemented extender. *Hayati Journal of Biosciences*. 2010; 17(1): 27-30.
  17. Hiron MH, Singh LP, Arangasamy A, Ansari MR and Kumar S. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (hbp) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2006; 93:124–133.
  18. Barati F, Khaksary Mahabady M and Mohammadi Gh. Cryopreservation of in situ cool stored buffalo (*bubalus bubalis*) epididymal sperm. *Iranian Journal of Veterinary Research*. Shiraz University 2009; 10(4): 29.
  19. Vilela CG, Marquez JM, Graham JK and Barfield JP. Cryopreservation of bison epididymal sperm: a strategy for improving post-thaw quality when collecting sperm in field conditions. *Theriogenology*. 2017; 89: 155-161.
  20. Herold FC, Haas KD, Cooper D, Colenbrander B, Nöthling JO, Theunisen W, Spillings B and Gerber D. Comparison of three different media for freezing of epididymal sperm from the african buffalo (*Syncerus caffer*) and influence of equilibration time on the post-thaw sperm quality. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 2004; 71:203–210.
  21. Shahverdi A, Rastegarnia A and Topraggaleh TR. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal* 2014; 16(3): 279-288.
  22. Asr ST, Beheshti R and Kohram H. The evaluations of tris-citrate acid or bioxcell extenders on the post-thawed buffalo sperm parameters. *Annals of Biological Research*. 2011;2(4):360-365.
  23. Herold FC, Haas KD, Colenbrander B and Gerber D. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from african buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. *Theriogenology* 2006; 66: 1123–1130.
  24. Camargos AS, Oba E, Monteiro GA, Sancler-Silva YFR, Zorzetto M, Maziero RRD, Papa FO and Ramos AA. Comparison of botu-bov and tris as freezing extenders of buffalo sperm recovered from epididymal cauda. *Buffalo Bulletin* 2013; 32 (2): 484-486
  25. Rizal M, Herdis, Yulnawati and Maheshwari H. The quality enhancement of epididymal spermatozoa of spotted buffalo cryopreserving with various sucrose concentrations. *Jurnal Veteriner* 2007; 8(4): 188-193.
  26. Singh LP, Hiron MH and Ansari MR. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2007; 99:395–400.
  27. Kumar A, Singh LP, Hiron HM and Majumdar AC. Seminal plasma non-heparin binding proteins (NHBP) reduce the cryoinjury to buffalo cauda epididymal spermatozoa induced by heparin binding proteins (HBP). *Animal Reproduction Science* 2008., 104; 220–226.
  28. Selçuk M ve Akal E. Testicular morphology and in vitro evaluation of frozen epididymal sperm of anatolian buffalo. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2015; 62: 51-55.
  29. Harissatria, Surtina D, Astuti T, Jaswandi and Hendri. Viability spermatozoa epididymis of buffalo (*bubalus bubalis*) in fertilized media to additional serum at temperature 5 °C. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 2019. doi:10.1088/1755-1315/347/1/012008
  30. Yeni D ve Avdatek F. Kısa süreli saklanan epididimal anadolu mandası spermasına ilave edilen karnosik asitin etkisi. *Kocatepe Vet J* 2017;10(3),187-195.
  31. Abdel-Aziz Swelum A, Saadeldin IM, Ba-Awadh H, Al-Mutary GM, Moumen AF, Alowaimer AN, Abdalla H. Efficiency of Commercial Egg Yolk-Free and Egg Yolk-Supplemented Tris-Based Extenders for Dromedary Camel Semen Cryopreservation. *Animals* 2019; 9: 999.
  32. Al-Essawe EM, Abraham C, Kunkitti P, Axner E, de Verdier K, Bâge R and Morrell JM. Extenders for alpaca epididymal spermatozoa: Comparison of INRA96 and andromed. *Animal Reproduction Science* 2020; 223, 106629.
  33. Sharma M, Singh M, Kapoor S and Jasial S. 2012. Inter relationship between some routine semen evaluation parameters in Jersey X local hill cattle crossbred bulls. *Open veterinary journal* 2012; 2(1): 26-31.