

Sperm Kriyoprezervasyonunda DNA Fragmantasyonunun Araştırılması: TUNEL Yöntemi

Investigation of DNA Fragmentation in Sperm Cryopreservation: TUNEL Assay

Pınar İLİ^{a,b}
Fikret SARI^c

^aTıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü,
Pamukkale Üniversitesi
Denizli Sağlık Hizmetleri
Meslek Yüksekokulu,
^bPamukkale Üniversitesi
Elektron Mikroskobu Birimi (PAÜEMB),
^cHistoloji ve Embriyoloji AD,
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Denizli

Geliş Tarihi/Received: 13.02.2017
Kabul Tarihi/Accepted: 21.06.2017

Yazışma Adresi/Correspondence:

Pınar İLİ
Pamukkale Üniversitesi
Denizli Sağlık Hizmetleri
Meslek Yüksekokulu,
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü,
Denizli, TÜRKİYE
pili@pau.edu.tr

ÖZET Kriyoprezervasyon, bozulmamış hücre ve dokuların yanı sıra çeşitli hayvan türlerinin sperm-lerinin düşük sıcaklıklarda düşük maliyetle uzun süre muhafaza edildiği bir depolama tekniğidir. Sperm kriyoprezervasyonu; evcil ve yabani tür populasyonlarında genetik çeşitliliğin korunması, "genetik olarak üstün" olan yerel türlerin dağıtımının kolaylaştırılması, iatrojenik infertilitenin tedavisi ve insan sağlığı ve hastalıkları için genetiği değiştirilmiş hayvan modellerinin gen bankacılığında kullanılması nedeniyle oldukça önemlidir. Ancak, kriyoprezervasyonda uygulanan dondurma-çözme işlemi sperm-lerimize çeşitli zararlar vermesi muhtemel bir işlem olarak kabul edilmektedir. Bu işlemin sperm-lerde geri dönüşümsüz hasarlara yol açtığı ve sperm-lerin membran bütünlüğü, morfolojisi ve hareketliliğini etkilediği bilinmektedir. Kriyoprezervasyon esnasında spermde meydana gelen hasarlar arasında en önemlisi DNA fragmantasyonudur. DNA fragmantasyonunun belirlenmesi için en sık kullanılan yöntem TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemidir. Bu derlemede DNA fragmantasyonu belirlenmesinde TUNEL yönteminin kullanımı ve bu yöntemin kullanıldığı güncel çalışmalar hakkında bilgiler sunulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sperm; kriyoprezervasyon; DNA hasarı; TUNEL yöntemi; fertilité

ABSTRACT Cryopreservation is a long-term storage technique with very low temperatures to preserve the sperm of various animal species as well as the structurally intact living cells and tissues for extended period of time at a low cost. Sperm cryopreservation is quite important because this technique is used for maintenance of genetic diversity in domestic and wild species populations, facilitating the distribution of "genetically superior" domestic species lines, treatment of iatrogenic infertility, and genetic banking of genetically modified animal models of human health and disease. However, freeze-thawing process applied in cryopreservation is accepted as a process that is likely to cause several damages to the sperm. It is known that this process results in permanent damages in sperm and influence the membrane integrity, morphology and motility of sperm. The most important one among the damages which occur in the sperm during cryopreservation is DNA fragmentation. The most commonly used method to detect DNA fragmentation is TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) assay. In this review, the knowledge about the use of TUNEL assay and recent studies in which this method has been used for detecting DNA fragmentation are presented.

Keywords: Sperm; cryopreservation; DNA damage; TUNEL assay; fertility

Kriyoprezervasyon, yapısal olarak bozulmamış canlı hücrelerin ve dokuların çok düşük sıcaklıklarda uzun süreler boyunca muhafaza edildiği, nispeten düşük maliyetli, uzun vadeli bir depolama tekniğidir.¹ Sperm-lerin kriyopre-

zervasyonu birçok nedenden dolayı önemlidir.² Bu nedenlerden en önemlileri şu şekilde sıralanabilir: 1) Evcil ve yabani tür popülasyonlarında genetik çeşitliliğin korunması;^{3,4} 2) “Genetik olarak üstün” olan yerel türlerin dağıtımının kolaylaştırılması;² 3) İatrojenik (cerrahi menopoz, radyasyon, kemoterapi kaynaklı) infertilitenin tedavisi;⁵⁻¹⁰ 4) İnsan sağlığı ve hastalıkları için genetiği değiştirilmiş hayvan modellerinin gen bankacılığı.^{4,11}

Kriyoprezervasyon birçok hayvan türünün spermeleri için oldukça yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Örneğin, deniz balıkları spermının kriyoprezervasyonu oldukça basit olduğu için, su ürünleri yetiştiriciliğinde uygulanabilmektedir.¹² Akuakültür endüstrisine kesinlikle fayda sağlayacak sperm kriyoprezervasyonunun faydaları arasında şunlar sayılabilir: 1) Her iki cinsiyette gamet varlığının senkronizasyonu; 2) Sperm ekonomisi; 3) Anaç yönetiminin basitleştirilmesi; 4) Farklı balık çiftliklerinden gametlerin taşınması; 5) Genetik seçim programları veya türlerin korunması için germplazm muhafazası.¹³ Kriyoprezervasyon büyükbaş hayvan yetiştiriciliğinde de yararlanılan bir tekniktir. Bu tekniğin boğa spermında koç spermine göre çok daha başarılı bir şekilde uygulanabildiği ve bu nedenle koyun yetiştirici-

liğinde kriyoprezervasyonun çok yaygın olarak kullanılmadığı bildirilmiş,¹⁴ ancak Bucak ve ark., bu tekniğin küçükbaş hayvanların spermalarında de kullanılabileceğine dair sonuçlar elde etmiştir.¹⁵

Kriyoprezervasyonda dondurma-çözme işlemi, spermelerde geri dönüşümsüz hasarlara neden olarak özellikle spermelerin membran bütünlüğü, plasmalemmaları, akrozomları, kuyrukları, morfolojisi, hareketliliği, mitokondriyal aktiviteleri ve yaşayabilirliği üzerinde zararlı etkilere sahiptir.¹⁶⁻¹⁹ Kriyoprezervasyonun hücreler üzerindeki etkileri çok iyi bilinmesine rağmen, literatürde dondurma-çözme prosedürü için eşsiz ve işlevsel bir protokolün kullanılmasına ve kriyoprezervasyonun sperm kromatin bütünlüğünü etkileyip etkilemediğine ilişkin herhangi bir karar birliği bulunmamaktadır.²⁰ Örneğin, insan spermeleri ile yapılan bazı çalışmalarda, dondurma-çözme işleminin DNA fragmentasyonu üzerine anlamlı bir etkiye sahip olmadığı sonucuna varılırken, bazı çalışmalarda ise kriyoprezervasyonun DNA fragmentasyonunu indükleyerek DNA üzerinde zararlı etkileri olduğu gösterilmiştir.²¹⁻²⁴ Kriyoprezervasyon işlemi sırasında çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlerin DNA yapısı üzerindeki potansiyel etkileri Tablo 1’de özetlenmiştir.

TABLO 1: Kriyoprezervasyonda çeşitli faktörlerin DNA üzerine etkisi.

Fiziksel ya da kimyasal faktörler (fizyolojik aralıklar dışında)		DNA üzerine etkisi
Kriyoprotektanlar	Etilen Glikol Kromatin hasarına neden olur. Artan hiper-kromozite, eliptikite ve premelt eğimini gösteren nihai erime profilini bozar. Polipeptide bağlı DNA'nın yüksek erime bölgesini, model kompleksleri ve kromatin içerisindeki daha yüksek düzenlenmiş yapıyı istikrarsızlaştırır ve azaltır. Erime sıcaklığına etki eder ve B'den C'ye kromatin dönüşümü yapar. ²⁵⁻²⁷ Dimetil sülfoksit Kromatin hasarına neden olur. DNA metilasyonu, DNA ve kromatinde yapı değişikliklerine neden olur. Heterokromatinin muhtemel konformasyonu ile DNA çift-zincir kırıkları onarımını kolaylaştırabilir. ^{25,27,28} Propilen glikol DNA metilasyonunu artırır. ²⁹ Gliserol DNA'nın konformasyonunu değiştirir, istikrarı bozucu bir etkiye sahiptir, T erimesini azaltır ve DNA'nın termal stabilitesini baskılar. ^{30,31}	
Hiperosmotik stres	Oksidatif stres kromatin gevşemesine, kromozomal sapmalara, DNA çift zincir kırıklarına ve sonuçta DNA fragmentasyonunda artışa neden olur. ^{32,33} Proteinlerin yanlış katlanmasına neden olur. ³⁴ Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükler. ³⁵ Artan süperoksit anyonu protein tirozin fosforilasyonunu artırır. ³⁶	
Sıcaklık	Soğuk denatürasyonuna (protein polar olmayan grupların su ile, çok spesifik ve kuvvetli sıcaklığa bağlı etkileşimi) neden olur. ^{37,38} Mutasyonları indükler. ³⁹	
pH	Deaminasyon, depurinasyon, depirimidasyona neden olur. ⁴⁰⁻⁴² Aşırı yüksek veya düşük pH DNA sarmalını dengesizleştirir ve erime noktasını değiştirir. ⁴³	
Reaktif oksijen türleri (ROS)	DNA fragmentasyonu, baz kaybı, tek-iplik kırıkları ve çift-iplik kırıkları, 8-hidroksiguanin üretimi, DNA-protein çapraz bağları, DNA instabilitesine neden olur. ⁴⁴⁻⁴⁹	

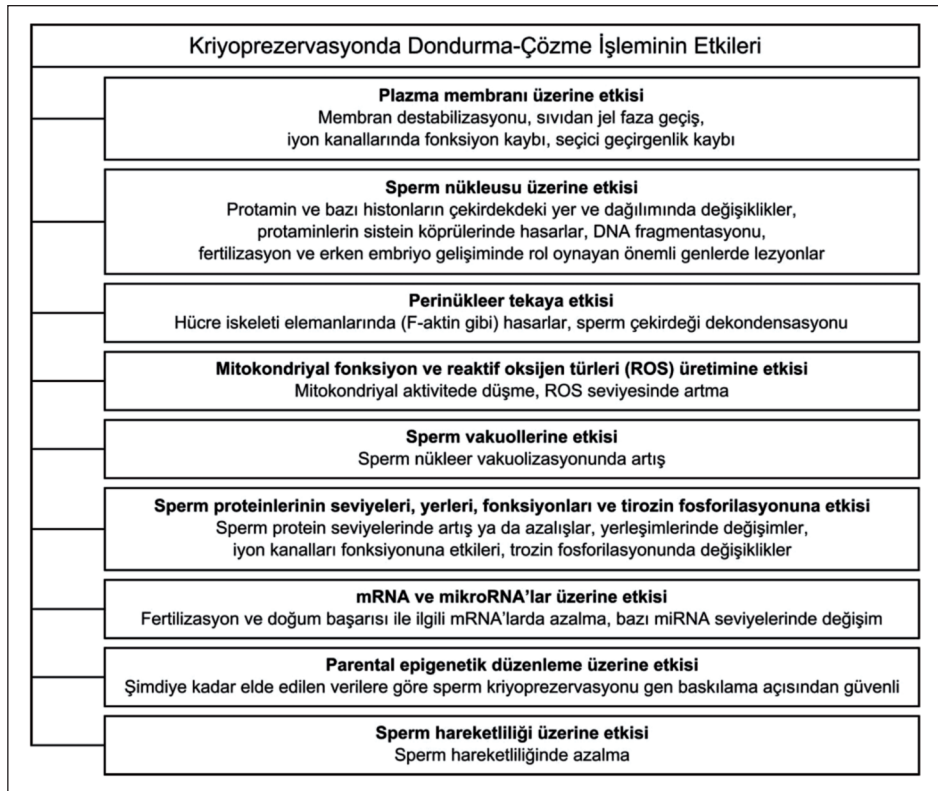
Bu derlemenin amacı, spermilerin kriyoprezervasyonu sırasında ortaya çıkan DNA fragmantasyonunun belirlenmesinde kullanılan TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemi ve bu yöntem kullanılarak yapılan son zamanlardaki bilimsel çalışmalar hakkında bilgi vermektir.

SPERM KROMATİN YAPISI VE KRIYOPREZERVASYON İLE ORTAYA ÇIKAN HASARLAR

Sperm kromatininin birincil yapısı üç ana kategoriye ayrılabilir: 1) Protaminlerle paketlenmiş DNA (büyük çoğunluğu); 2) Histon bağlı kromatin (yaklaşık %2-15'i); 3) Yaklaşık 50 kb aralıklarla nükleer matrisle tutunan DNA. Mevcut veriler, son iki yapısal elementin döllenmeden sonra baba pronükleusuna aktarıldığını ve önemli işlevsel rollere sahip olduklarını düşündürmektedir. Nükleer matris organizasyonu DNA replikasyonu için gereklidir ve histona bağlı kromatin, embriyonik gelişim için önemli genleri taşır.⁵⁰ Dondurma-çözme işleminin, DNA içindeki disülfid bağlarının kopmasıyla bağlantılı mekanizma ya da mekanizmalar yoluyla domuz sperm başı nükleoprotein yapısında belirgin değişikliklere sebep

olduğu ve bu mekanizmaların, spesifik olmayan bir şekilde hem protamin-DNA birliğine, hem de histon-DNA bağlarına benzer şekilde etki ettiği bilinmektedir.⁵¹ Ayrıca kriyoprezervasyonun sperm plazma membranı, sperm nükleusu, perinükleer teka, mitokondriyal aktivite ve ROS, sperm vakuolleri, sperm proteinlerinin seviyesi, lokasyonu ve fonksiyonu ile sperm hareketliliği üzerine etkileri olduğu belirtilmektedir.⁵² Kriyoprezervasyonda uygulanan dondurma-çözme işleminin sperm üzerine etkileri Şekil 1'de gösterilmektedir.

Kriyoprezervasyona bağlı DNA hasarının etiolojisiindeki mekanizmaları açıklamaya çalışan çalışmalar sınırlıdır.⁵³ Kriyoprezervasyonda, işleme bağlı olarak spermde aktive olan kaspazlar ya da oksidatif stresin DNA hasarlarına neden olabileceği düşünülmektedir.^{16,23,47,49,54,55} Ayrıca, dondurma-çözme işlemi sonrasında sperm kalitesinde meydana gelen bozulmanın, apoptotik süreçlerin aktivasyonundan ziyade, hücrelerde doğrudan oluşan hasarlardan kaynaklanması muhtemeldir.⁵⁶ Spermde herhangi bir sebepten ortaya çıkan kromatin anormallikleri veya DNA hasarı, erkek infertilitesine neden olur ve *in vivo* fekdite (bir siklusta canlı doğuma kadar gidebilecek gebelik oluşma olasılığı), spermilerin %30'dan fazlasının DNA hasarına sahip olduğu durumlarda giderek



ŞEKİL 1: Sperm kriyoprezervasyonunda uygulanan dondurma-çözme işleminin sperm üzerine olası etkileri. Şekil, Yeste (2016)'ye göre oluşturulmuştur.

azalmaktadır.⁵⁷ Bu nedenle, spermelerde DNA fragmantasyonunun araştırılması, fertilité potansiyelinin tespit edilmesinde oldukça önemlidir.⁵⁸⁻⁶¹

SPERM KRİYOPREZERVASYONU İLE ORTAYA ÇIKAN DNA HASARLARININ TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

DNA-protamin yoğunlaşmasının derecesi, DNA'daki kırılma ve çentik insidansı ve çekirdeğin alt-haploid apoptotik cisimlere parçalanma frekansı değerlendirilerek sperm DNA'sının bütünlüğü üç farklı düzeyde ölçülebilmektedir.⁶² Spermelerde DNA hasarlarının araştırılmasında DNA hasarının farklı yönlerini ölçen ve farklı duyarlılıklara sahip DNA testleri kullanılmaktadır.⁶³ Sperm DNA bütünlüğünün araştırılmasında kullanılan testler şu şekilde sıralanabilir: 1) Sperm kromatin yapısı tayini [sperm chromatin structure assay (SCSA)]; 2) Akridin turuncu testi [acridine orange test (AOT)]; 3) Toluidin mavisi [toluidine blue (TB)]; 4) Anilin mavisi (aniline blue); 5) Asıl çentik okuma tayini [in situ nick translation assay (NT)]; 6) Tek hücre jel elektroforezi (COMET); 7) Sperm kromatin ayrılma testi [halosperm test (sperm chromatin dispersion test)]; 8) TUNEL yöntemi.^{60,63-65}

TUNEL YÖNTEMİ

TUNEL yöntemi, DNA çift ya da tek zincir kırıklarının serbest 3'-OH uçlarını, modifiye edilmiş nükleotitler (dUTP) ile enzimatik (TdT) olarak etiketleyerek, hem mikroskopik (ışık ya da floresan) hem de akış sitometri yöntemleri ile sperm DNA fragmantasyonu tespitine olanak sağlamaktadır.^{60,66-68} TUNEL yönteminde DNA frag-

mantasyonu kolorimetrik ya da florometrik olarak belirlenebilmektedir. Kolorimetrik yöntemde peroksidaz ya da alkalın fosfataz tabanlı sistemler kullanılmaktadır (Şekil 2). Spermier mikroskopik olarak incelendiğinde, sperm baş kısmında boyamanın varlığına bağlı olarak TUNEL+ olarak nitelendirilmektedir (Şekil 3).

Yöntem uygulanırken, kullanılan kit prosedürü dikkate alınmakla birlikte, genel olarak takip edilebilecek TUNEL prosedürü aşağıdaki gibidir:

1. Örneklerin Hazırlanması: Sıvı azot içindeki spermier içeren payetler, 35°C su banyosunda 25 sn. tutularak çözülür.

2. 800 xg'de, 20°C'de 10 dk. santrifüj edilen spermierden kriyoprotektanlar uzaklaştırılır.

3. PBS (fosfat tamponlu tuz; pH 7,4) ile yıkanan spermier daha sonra, yaklaşık olarak mililitrede 10 ya da 20x10⁶ sperm olacak şekilde PBS ile dilüe edilir.

4. Poly-L-lizin ya da silan kaplı lama 10 µl örnek koyularak, simir şeklinde yayılır ve slaytlar açık havada kurutulur.

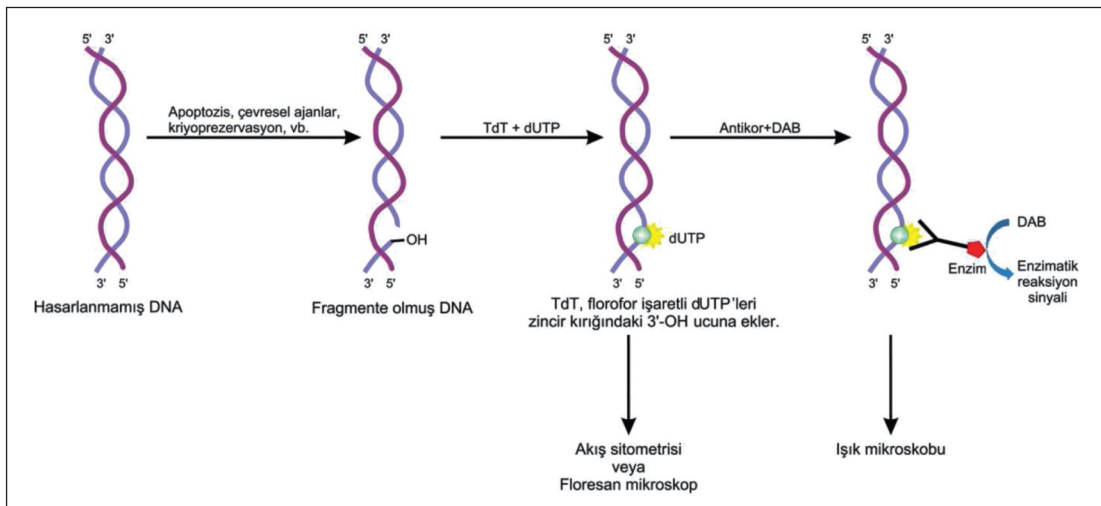
NOT: Her örnek için en az 2 slayt hazırlanmalıdır.

5. Fiksasyon: Slaytlar taze hazırlanmış paraformaldehitte (%4'lük, PBS'de; pH 7,4) 15-25°C'de, 1 saat fikse edilir.

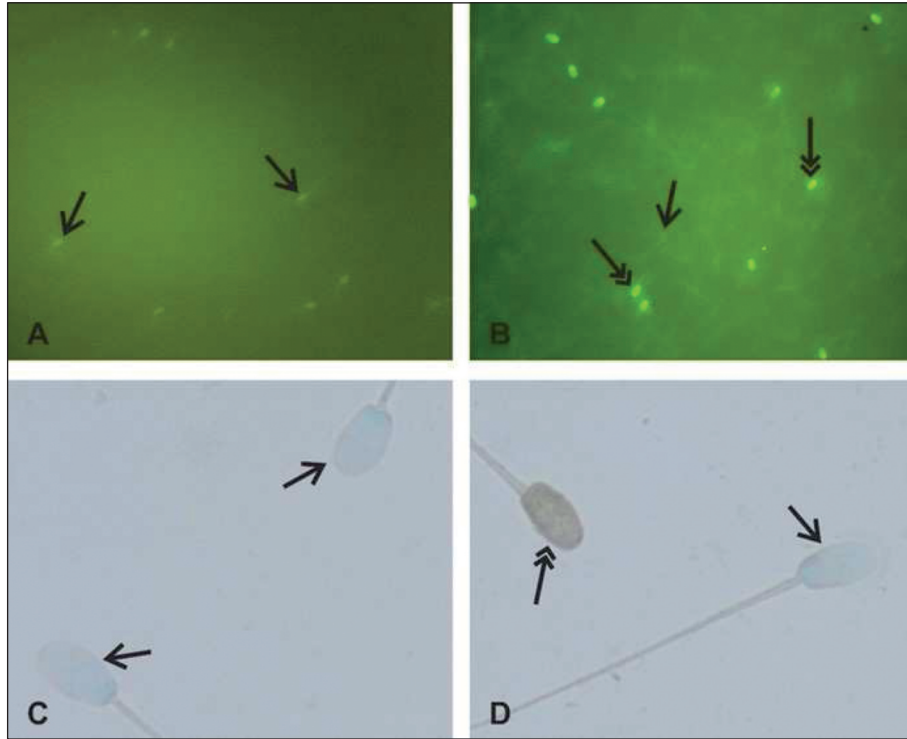
6. Slaytlar PBS ile yıkanır (3x2 dk.).

NOT: Fazla PBS süzülerek uzaklaştırılır.

7. Enzim Uygulaması: Slaytlar 10 mM Tris-HCl içinde 20 µg/ml proteinaz K (DNAaz/RNAaz içermeyen) ile oda ısısında 10 dk. inkübe edilir.



ŞEKİL 2: TUNEL yönteminin mekanizması. TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase; dUTP: Deoksiuridin trifosfat; DAB: 3,3'-diaminobenzidin.



ŞEKİL 3: Çeşitli kriyoprotektanlar içinde bulunan Merinos koç (A ve B) ve tavşan (C ve D) spermelerinde dondurma-çözme işlemi sonrasında DNA fragmentasyonu bulunan TUNEL+ (çift başlı ok) ve DNA fragmentasyonu bulunmayan (ok) hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi. A (negatif kontrol) ve B, Floresan boyama; C (negatif kontrol) ve D, DAB boyama. Orijinal büyütme 400x (A ve B) ve 1000x (C ve D).

8. Endojen Peroksidaz İnhibisyonu: Slaytlar blok-lama solüsyonu (%3 H₂O₂, metanolde) ile 15-25°C'de, 10 dk. inkübe edilir.

9. Slaytlar PBS ile yıkanır (3x2 dk.).

10. Şeffaflaştırma: Taze hazırlanmış şeffaflaştırma solüsyonu (%0,1 Triton X 100 ve %0,1 sodyum sitrat) ile buz üstünde 5 dk. inkübe edilir.

11. Slaytlar PBS ile yıkanır (2x2 dk.).

12. İşaretleme: Slaytlar nem odası içinde, 37°C'de 1 saat, TUNEL reaksiyon karışımında [enzim (TdT)+label solüsyonu (fluorescein-dUTP vb.)] ile karanlıkta inkübe edilir.

13. Slaytlar PBS ile yıkanır (3x2 dk., karanlıkta).

NOT: Bu aşamadan sonra örnekler floresan mikroskopta incelenebilir.

14. Sinyal Dönüştürme ya da Antikor Reaksiyonu: Örnekler HRP (horse-radish peroxidase) konjuge anti-korla (anti-florescein, anti-FITC vb.) nem odası içinde, 37°C'de 30 dk. inkübe edilir.

15. Slaytlar PBS ile yıkanır (3x2 dk.).

16. Renk Oluşturma: Örnek başına 100 µl DAB

substrat eklenerek, oda sıcaklığında renk oluşumu gözlenene kadar (yaklaşık 10-15 dk.) beklenir.

17. Slaytlar PBS ile yıkanır (3x2 dk.).

18. Zıt Boyama: Örnekler, %0,5'lik metil yeşili içinde 10 dk. boyanır. Daha sonra örnekler, 2 farklı saf su kabı içinde, 10'ar kere daldırılıp çıkartılarak yıkanır. 30 sn. saf su içinde bekletilen örnekler, 2 farklı n-bütanol içinde, 10'ar kere daldırılıp çıkarılarak yıkanır. Son olarak 30 sn. daha n-bütanol içinde bekletilir.

19. Kapatma: Örnekler 3x2 dk. ksilende tutulur. Lamlar ksilenden çıkarılarak, kenarlarından damlayan fazla ksilen kurutma kağıdına emdirilir, fakat lamların kurumalarına izin verilmez. Lamlar daha sonra kapatma malzemesi (entellan gibi) yardımıyla cam bir lamel kullanılarak kapatılır.

Değerlendirme: Her slaytta 100 hücre sayılarak, TUNEL+ hücre yüzdesi ortalama±standart sapma olarak ifade edilir ve gruplar istatistiksel olarak karşılaştırılır.

Negatif kontrol: Örnekler sadece label solüsyonu ile inkübe edilir.

TUNEL yöntemi, az sayıda sperm üzerine uygulanabilmesi, pahalı ekipmanlar gerektirmemesi, apoptozisi

TABLO 2: Farklı hayvan türlerinde TUNEL yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş bazı çalışmalara ait özet bilgiler.

Örnek	İnceleme yöntemi	Sonuç	Kaynak
Arı	Floresan mikroskop	Dondurma-çözme sonrasında ortaya çıkan DNA fragmentasyonu frekansındaki küçük artış, muhtemelen sıvı deplama sırasındaki şartlara ya da doğal nedenlere bağlı olan dondurulmamış numuneler arasındaki büyük değişimlere karşılaştırdığında göz ardı edilebilir.	79
Balık	Akış sitometri	Dondurma-çözme sonrasında, 10 farklı kriyoprezervatif içindeki (taurin ve hipotaurin (1-10 mM); askorbik asit (1-10 mM); α -tokoferol (0,1-0,5 mM)) ya da 1 ml/1 ticari hücre antioksidan takviyesi) iki türe ait spermelerde, DNA fragmentasyonu açısından anlamlı bir fark yoktur. Cinsiyet değiştirilmiş gökkuşuğu alabalığı spermeleri farklı kriyoprezervatiflerde [standart balık sperm tamponu+%20 DMSO+%20 BSA+0,13 M sukroz+seminal plazma (%30-grup 1; %40-grup 2; %50-grup 3) ve taze sperm (kontrol)] dondurulmuş ve grup 3'te DNA fragmentasyonunda anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür.	80 81
Koç	İşık mikroskopu	Kriyoprotektan içerisinde rafinoz ve hipotaurin+rafinoz bulunan gruplarda kontrole göre anlamlı şekilde daha az sayıda TUNEL+ sperm vardır.	15
	Floresan mikroskop	Dondurma-çözme işlemi DNA bütünlüğü üzerine negatif etkiye sahiptir. Kriyoprotektan içerisinde fenolik bileşenlere sahip %1 oranında Opuntia ficus-indica aseton ekstraktı ilavesi, dondurma işleminin DNA bütünlüğü üzerine negatif etkisini azaltmaktadır.	82 83
		DNA bütünlüğü ile hareketlilik arasında pozitif bir ilişki vardır ve kriyoprotektanın 1 mM sisten ile desteklenmesi DNA bütünlüğünün iyileştirilmesi için çok önemli bir etkiye sahiptir.	84
Keçi	Floresan mikroskop	Keçi sperm DNA bütünlüğü bir dereceye kadar domma oranından etkilenir ve dondurma oranının 10°C'dk. dan 24°C'dk. ya +5°C ile -150°C arasında artması, çözme ile DNA hasarının artmasına neden olur.	85
Domuz	Floresan mikroskop	Kullanılan hiçbir kriyoprezervatif (36 ejakülat son konsantrasyonları 0 (kontrol), 150 IU/ml SOD (grup I), 5,0 mM GSH (grup II), 300 IU/ml SOD (grup III), 300 IU/ml SOD (grup IV), 200 IU/ml CAT (grup V), 400 IU/ml CAT (grup VI), 150 IU/ml SOD+200 IU/ml CAT (grup VII), 300 IU/ml SOD+400 IU/ml CAT (grup VIII)) olacak şekilde laktöz-yumurta sarısı-gliserol kriyoprezervatif içinde suspanse edilmiş [çindeki sperm için dondurma-çözme işlemi DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır].	86
		Kriyoprezervasyon işlemi, kontrol veya modifiye edilmiş kriyoprezervatiflerde [beş yaban domuzundan (36 ejakülat) alınan sperm, 0 (kontrol), 1,0 (R1), 1,5 (R2) veya 2,0 mM bütillenmiş hidroksitolen (R3) ile takviye edilmiş laktöz-yumurta sarısı-gliserol kriyoprezervatif içinde suspanse edilmiş] spermde DNA parçalanmasına neden olmaktadır.	87
Manda	İşık mikroskopu	Dondurulmuş ve taze spermelerde TUNEL+ hücre yüzdeleri arasında fark anlamlı değildir ve bu sonuç manda sperm DNA bütünlüğünün kriyoprezervasyon ve çözülme işleminin etkilenmediğini göstermektedir.	88
	Floresan mikroskop	Taze ya da dondurulmuş çözülmüş örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.	89
Boğa	Akış sitometri	Taze spermier ile karşılaştırıldığında, dondurma-çözme işlemi, incelenen tüm örneklerde apoptotik (DNA-nicked) sperm yüzdesini düşürmektedir.	77
	Floresan mikroskop	Farklı lilyolizasyon ortamlarıyla korunmuş boğa sperm hücrelerinin DNA hasarını araştırmak için akrinin turuncu ve TUNEL tekniği karşılaştırıldığında, TUNEL tekniği sperm değerlendirmek için daha duyarlı bir yöntemdir ve erkek fertilitasını tahmin etmek için bir araç olarak kullanılabilir.	90
		Kriyoprezervasyon mihun (gaya) spermünde apoptozu indüklemektedir. Dengeleme, dondurma ve çözme aşamalarından sonra apoptotik sperm yüzdeleri anlamlı derecede yüksektir.	91
		Sperm DNA hasarı temelinde semen kalitesinin daha kapsamlı bir tanımı sağlamak için sperm TUNEL indeksi ek bir parametre olarak kullanılabilir ve suni döllemeden önce bu testlerin yapılması sigır yetiştiriciliği maliyetini önemli ölçüde azaltmaktadır.	92
Köpek	Floresan mikroskop	Sukroz, ultra hızlı kriyoprezervasyon sırasında DNA bütünlüğü gibi önemli fizyolojik parametreleri etkili bir şekilde muhafaza edilebilmektedir.	93
İnsan	Akış sitometri	Dondurma-çözme işlemi DNA fragmentasyonu üzerine anlamlı bir etkiye sahip değildir.	21
	İşık mikroskopu	Kriyoprezervasyon, DNA fragmentasyonunu indükleyerek DNA üzerinde zararli etkilere sahiptir.	24
	Floresan mikroskop	Oligospermik ve normospermik örneklerde, kriyoprezervasyon sonrasında DNA fragmentasyonu artmaktadır. Dondurma-çözme işlemi DNA fragmentasyonu üzerine anlamlı bir etkiye sahip değildir.	94 22
		Kriyoprezervasyon, DNA fragmentasyonunda anlamlı bir artışa neden olur ve DNA fragmentasyonu, kasparazim aktivasyonu ve apoptozdan çok, kriyoprezervasyon sırasında oksidatif stresin artması ile ilişkilidir.	47
		Sperm nükleer DNA fragmentasyonu, yavaş dondurulan grupta hızlı dondurma grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüktür ve normozospermik erkeklerde sperm kriyoprezervasyonunda yavaş dondurma yöntemi tercih edilmelidir.	95
		Dondurma-çözme işlemi, sperm DNA'sı fragmentasyonunun artmasını ve suni döllemede fertilité potansiyelinin azalmasını indüklemektedir.	96
		Normal dondurma mediyumu (kontrol), 5 mM glutatyon ya da 0,5 mM bütillenmiş hidroksitolen (BHT) içeren mediyum içinde dondurulan spermelerde, DNA fragmentasyonu 0,5 mM BHT içeren grupta diğer iki gruba göre anlamlı şekilde düşüktür.	97
		Bir ay süreyle spermierin dondurulmasında yavaş programlanabilir dondurma ve ultra hızlı dondurma yöntemlerinde DNA bütünlüğünün yuzdesi önemli ölçüde azalmıştır ancak iki yöntem arasında anlamlı bir fark yoktur.	98

de işaret etmesi, ticari kitlerinin bulunması, basit, hızlı, yüksek hassasiyete sahip, semen parametreleri ve fertilitite ile alakalı bir yöntem olması nedeniyle sperm DNA fragmentasyonu değerlendirilmesinde yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir.⁶⁷ Sperm DNA fragmentasyonunu doğrudan tespit eden ve sonuçları diğer yöntemlerle karşılaştırılabilen bir yöntem olan TUNEL yöntemi,⁶⁹ kabul görmüş bir laboratuvar testidir ve bu test sayesinde hasarlı genetik yapıdaki spermlerden korunabilmek ve fertilizasyon başarısını artırmanın yanı sıra, embriyo, fetüs ve yavrunun normal gelişimini sağlamak mümkün olabilmektedir.⁷⁰

KRİYOPREZERVASYONDA SPERM DNA FRAGMENTASYONUNUN TUNEL YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Tüm hücreler, kriyoprezervasyon işleminde benzer fiziksel streslere maruz kalsalar da, farklı türlerin spermelerinin boyut, şekil ve lipid kompozisyonunun birbirinden çok farklıdır ve bunların hepsi kriyo sağkalımını etkiler.⁷¹ Dondurma-çözme işlemi sonrasında çeşitli kriyoprotektanlar içindeki domuz, koç, keçi, boğa ve insan spermelerindeki DNA fragmentasyonunu araştırmak için TUNEL tekniğini kullanan pek çok çalışma bulunmaktadır.⁷²⁻⁷⁸ Bu konuda çeşitli türlerde gerçekleştirilmiş çalışmalardan bazıları Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2’de özetlenen çalışmalardan elde edilen bazı kanıtlar, dondurma-çözme sonrasında spermelerde DNA tek iplik kırıkları ile DNA yoğunlaşma veya parçalanma derecelerinin arttığını, bu değişikliklerin örnekler ve kullanılan tekniklere göre değişebildiğini ve kriyoprezervatiflere antioksidan ilavesi ve iyi kontrollü soğutma rejimleri kullanılmasının bu sonuçları potansiyel olarak iyileştirebileceğini göstermektedir.⁹⁹

SONUÇ

Dondurma-çözme sonrasında DNA hasar değerlendirilmesi, kromozom anatomisinin kriyo hasarları azaltmak için kriyoprezervasyon protokollerinin optimizasyonu ile iyileştirilmesine olanak tanımaktadır.¹⁰⁰ TUNEL yöntemi birçok avantajı olması nedeniyle, kriyoprezervasyonda sperm DNA hasarlanmalarının kontrolünde oldukça yaygın kullanılmaktadır.⁶⁷ Kriyoprezervasyon uygulanan spermeler kullanılarak gerçekleştirilecek gebeliklerin sonuç vermesi ve normal bir gebeliği takiben sağlıklı yavrular elde edilebilmesi amacıyla, dondurma-çözme sonrasında spermelerin mutlaka DNA hasarlarından ari halde olduğundan emin olunmalıdır. Kullanılan kriyoprotektan maddelerden hangisi/hangilerinin bu amaca daha fazla hizmet ettiği TUNEL yöntemi ile sınırlanmalı ve bu vesile ile türlerin geleceği genetik açıdan garanti altına alınmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Tsai S, Lin C. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Braz Arch Biol Techn* 2012;55(3):425-33.
2. Walters EM, Benson JD, Woods EJ, Critser JK. The history of sperm cryopreservation. In: Pacey AA, Tomlinson MJ, eds. *Sperm Banking: Theory and Practice*. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. p.1-17.
3. Wildt DE. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Anim Reprod Sci* 1992;28(1-4):247-57.
4. Critser JK, Russell RJ. Genome resource banking of laboratory animal models. *ILAR J* 2000;41(4):183-6.
5. Mocé E, Fajardo AJ, Graham JK. Human sperm cryopreservation. *Eur Med J* 2016;1(1):86-91.
6. Williams DH. Sperm banking and the cancer patient. *Ther Adv Urol* 2010;2(1):19-34.
7. Agarwal A, Ranganathan P, Kattal N, Pasqualotto F, Hallak J, Khayal S, et al. Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. *Fertil Steril* 2004;81(2):342-8.
8. Nalesnik JG, Sabanegh ES Jr, Eng TY, Buchholz TA. Fertility in men after treatment for stage 1 and 2A seminoma. *Am J Clin Oncol* 2004;27(6):584-8.
9. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol* 2003;170(4 Pt 1):1079-84.
10. Ranganathan P, Mahran AM, Hallak J, Agarwal A. Sperm cryopreservation for men with non-malignant, systemic diseases: a descriptive study. *J Androl* 2002;23(1):71-5.
11. Critser JK, Mobraaten LE. Cryopreservation of murine spermatozoa. *ILAR J* 2000;41(4):197-206.
12. Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billaud R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac Res* 2000;31(3):231-43.
13. Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cereales S, et al. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J Appl Ichthyol* 2010;26(5):623-35.
14. Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62(1-3):77-111.
15. Bucak MN, Keskin N, Taşpınar M, Çoyan K, Başpınar N, Cenariu MC, et al. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology* 2013;67(1):34-9.
16. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online* 2010;21(4):456-62.
17. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 2008;25(8):403-11.
18. O’Connell M, McClure N, Lewis SE. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2002;17(3):704-9.

19. Barthelemy C, Royere D, Hammah S, Lebos C, Tharanne MJ, Lansac J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Arch Androl* 1990;25(1):29-40.
20. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol* 2012;2012:Article ID 854837, 12 pages.
21. Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, et al. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 2004;71(6):1828-37.
22. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl* 2001;22(4):646-51.
23. Ribas-Maynou J, Fernández-Encinas A, García-Peiró A, Prada E, Abad C, Amengual MJ, et al. Human semen cryopreservation: a sperm DNA fragmentation study with alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2014;2(1):83-7.
24. Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity]. *Fertil Steril* 2010;93(1):159-66.
25. Taşdemir U, Büyükleblebici S, Tuncer, PB, Coşkun E. Özgürtaş, T, Aydin, FN, et al. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology* 2013;66(1):38-42.
26. Schwartz AM, Fasman GD. Thermal denaturation of chromatin and lysine copolymer-DNA complexes. Effects of ethylene glycol. *Biopolymers* 1979;18(5):1045-63.
27. Nelson RG, Johnson WC Jr. Conformation of DNA in ethylene glycol. *Biochem Biophys Res Commun* 1970;41(1):211-6.
28. Kashino G, Liu Y, Suzuki M, Masunaga S, Kinashi Y, Ono K, et al. An alternative mechanism for radioprotection by dimethyl sulfoxide; possible facilitation of DNA double-strand break repair. *J Radiat Res* 2010;51(6):733-40.
29. Hu W, Marchesi D, Qiao J, Feng HL. Effect of slow freeze versus vitrification on the oocyte: an animal model. *Fertil Steril* 2012;98(3):752-60.
30. Sorokin VA, Gladchenko GO, Valeev VA, Sysa IV, Petrova LG, Blagoi YuP. Effect of salt and organic solvents on DNA thermal stability and structure. *J Mol Struct* 1997;408-409:237-40.
31. Nakanishi S, Adhya S, Gottesman M, Pastan I. Activation of transcription at specific promoters by glycerol. *J Biol Chem.* 1974;249(13):4050-6.
32. Johnston SD, Satake N, Zee Y, López-Fernández C, Holt WV, Gosálvez J. Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. *Reproduction* 2012;143(6):787-97.
33. Kultz D, Chakravarty D. Maintenance of Genomic Integrity in Mammalian Kidney Cells Exposed to Hyperosmotic Stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;130(3):421-8.
34. Oganessian N, Ankoudinova I, Kim SH, Kim R. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein Expr Purif* 2007;52(2):280-5.
35. McCarthy MJ, Baumber J, Kass PH, Meyers SA. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biol Reprod* 2010;82(3):644-51.
36. Burnaugh L, Ball BA, Sabeur K, Thomas AD, Meyers SA. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Anim Reprod Sci* 2010;117(3-4):249-60.
37. Privalov PL. Cold denaturation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1990;25(4):281-305.
38. Marenduzzo D, Trovato A, Maritan A. Phase diagram of force-induced DNA unzipping in exactly solvable models. *Phys Rev E* 2001;64(3 Pt 1):031901.
39. Todorova T, Pesheva M, Stamenova R, Dimitrov M, Venkov P. Mutagenic effect of freezing on nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2012;29(5):191-9.
40. Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1972;11(19):3610-8.
41. Wang RY, Kuo KC, Gehrke CW, Huang LH, Ehrlich M. Heat- and alkali-induced deamination of 5-methylcytosine and cytosine residues in DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1982;697(3):371-7.
42. An R, Jia Y, Wan B, Zhang Y, Dong P, Li J, et al. Non-enzymatic depurination of nucleic acids: factors and mechanisms. 2014;PLOS ONE 9(12):e115950.
43. Williams MC, Wenner JR, Rouzina I, Bloomfield VA. Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA: evidence of force-induced DNA melting. *Biophys J* 2001;80(2):874-81.
44. Jeng HA, Pan CH, Chao MR, Lin WY. Sperm DNA oxidative damage and DNA adducts. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2015;794:75-82.
45. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* 2012;46(4):382-419.
46. Jena NR. DNA damage by reactive species: mechanisms, mutation and repair. *J Biosci* 2012;37(3):503-17.
47. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iulius GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod* 2009;24(9):2061-70.
48. Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 2007;74(7):878-92.
49. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 2003;24(4):621-8.
50. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010;16(1):30-6.
51. Flores E, Ramió-Lluch L, Buccì D, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE. Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology* 2011;76(8):1450-64.
52. Yeste M. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 2016;85(1):47-64.
53. Paoli D, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. *Adv Exp Med Biol* 2014;791:137-50.
54. Wünderlich K, Paasch U, Leicht M, Glander HJ. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation - an immunoblot study. *Cell Tissue Bank* 2006;7(2):81-90.
55. Castro LS, Hamilton TR, Mendes CM, Nichi M, Barnabe VH, Visintin JA, et al. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. *J Anim Sci Biotechnol* 2016;7(17):1-9. doi: 10.1186/s40104-016-0076-x.
56. Prochowska S, Nizański W, Partyka A. Low levels of apoptotic-like changes in fresh and cryopreserved feline spermatozoa collected from the urethra and epididymis. *Theriogenology* 2017;88:43-9.
57. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9(4):331-45.
58. Aıçay S, Tokar B, Üstüner B, Nur Z, Sağırkaya H, Soyulu MK. Investigation of relationships between DNA integrity and fresh semen parameters in rams. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2014;20(5):793-8.
59. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwerzman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006;8(1):11-29.
60. Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 2006;65(5):979-91.

61. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013;1(5):715-22.
62. Silva PF, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006;65(5):958-78.
63. Lewis SEM. The place of sperm DNA fragmentation testing in current day fertility management. *Middle East Fertil Soc J* 2013;18(2):78-83.
64. Koyuncu H. Methods for the determination of sperm DNA damage. *Turk Urol Sem* 2011;2:18-23.
65. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 2000;22(2-3):169-89.
66. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993;53(8):1945-51.
67. Sharma R, Agarwal A. Laboratory evaluation of sperm chromatin: TUNEL Assay. In: Zini A, Agarwal A, eds. *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. New York: Springer; 2011. p.201-215.
68. Mohan C, Long K, Mutneja M, Ma J. Detection of end-stage apoptosis by ApopTag® TUNEL technique. *Methods Mol Biol* 2015;1219:43-56.
69. Loo DT. TUNEL assay: an overview of techniques. In: Didenko VV, ed. *In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols*. New York: Humana Press Inc.; 2002. p.21-30.
70. Tavukçuoğlu İŞ, Al-Azawi T, Khaki AA, Khaki A, Khalil A, Al-Hasani S. Clinical value of DNA fragmentation evaluation tests under ART treatments. *J Turk Ger Gynecol Assoc* 2012;13(4):270-4.
71. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res* 2006;63(3):215-25.
72. Bryła M, Trzcińska M. Quality and fertilizing capacity of boar spermatozoa during liquid storage in extender supplemented with different antibiotics. *Anim Reprod Sci* 2015;163:157-63.
73. Alcay S, Ustuner B, Nur Z. Effects of low molecular weight cryoprotectants on the post-thaw ram sperm quality and fertilizing ability. *Small Rumin Res* 2016a;136:59-64.
74. Alcay S, Gokce E, Toker MB, Onder NT, Ustuner B, Uzabacı E, et al. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology* 2016b;72(3):269-73.
75. Allai L, Druart X, Contell J, Louanjli N, Moulia AB, Badi A, et al. Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris or skim milk based extenders. *Anim Reprod Sci* 2015;160:57-67.
76. Gillan L, Evans G, Maxwell WM. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 2005;63(2):445-57.
77. Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod* 2002;66(2):354-60.
78. Tamburrino L, Cambi M, Marchiani S, Manigrasso I, Degl'Innocenti S, Forti G, et al. Sperm DNA fragmentation in cryopreserved samples from subjects with different cancers. *Reprod Fertil Dev* 2015; doi: 10.1071/RD15190.
79. Wegener J, May T, Kamp G, Bienefeld K. A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology* 2014;69(2):236-42.
80. Cabrita E, Ma S, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C, Dinis MT. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Anim Reprod Sci*. 2011;125(1-4):189-95.
81. Figueroa E, Risopatrón J, Sánchez R, Isachenko E, Merino O, Isachenko V, et al. Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture* 2013;372-375:119-26.
82. Alcay S, Toker MB, Gokce E, Ustuner B, Onder NT, Sagirkaya H, et al. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology* 2015;71(2):329-33.
83. Allai L, Druart X, Öztürk M, BenMoula A, Nasser B, El Amiri B. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. *Anim Reprod Sci* 2016;175:1-9.
84. Toker MB, Alcay S, Gokce E, Ustuner B. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology* 2016;72(3):205-9.
85. Üstüner B, Nur Z, Alçay S, Toker MB, Sağırkaya H, Soyulu MK. Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. *Turk J Vet Anim Sci* 2015;39:110-4.
86. Trzcińska M, Bryła M. Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Pol J Vet Sci*. 2015;18(3):473-80.
87. Trzcińska M, Bryła M. The use of butylated hydroxytoluene in cryopreservation of boar semen. *Sci Ann Pol Soc Anim Prod* 2016;12(2):21-8.
88. Kadirvel G, Periasamy S, Kumar S. Effect of cryopreservation on apoptotic-like events and its relationship with cryocapacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm. *Reprod Domest Anim* 2012;47(1):143-50.
89. Kumar D, Kumar P, Singh P, Yadav SP, Yadav PS. Assessment of sperm damages during different stages of cryopreservation in water buffalo by fluorescent probes. *Cytotechnology* 2016;68(3):451-8.
90. Martins CF, Dode MN, Báo SN, Rumpf R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet Mol Res*, 2007;6(1):94-104.
91. Bora B, Savino N, Baruah KK, Mukherjee A, Perumal P. Effect of cryopreservation on apoptosis of mithun (*Bos frontalis*) spermatozoa. *Indian Vet J* 2015;92(2):66-8.
92. Takeda K, Uchiyama K, Kinukawa M, Tagami T, Kaneda M, Watanabe S. Evaluation of sperm DNA damage in bulls by TUNEL assay as a parameter of semen quality. *J Reprod Dev* 2015;61(3):185-90.
93. Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas J, Isachenko, Kreinberg R, et al. Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia* 2011;43(4):233-41.
94. de Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril* 2006;86(3):597-600.
95. Jee BC, Chang HJ, Jeon YT, Lee JR, Suh CS, Kim SH. Comparison of human sperm quality and nuclear DNA integrity between slow and rapid freezing. *J Womens Med* 2010;3(2):57-62.
96. Peirouvi T, Sadaghiani M, Noroozina F, Salami S, Abed F. Detection of apoptosis in ejaculated human spermatozoa before and after vapor freezing. *J Reprod Stem Cell Biotechnol (Suppl)* 2011;2(1):77-9.
97. Ghorbani M, Tavilani H, Khodadadi I, Amiri I. Comparisons between two antioxidant butylated hydroxytoluene and glutathione supplemented cryopreservation medium on human sperm DNA integrity. *Anat Sci J* 2015;12(2):93-6.
98. Tongdee P, Sukprasert M, Satirapod C, Wongkularb A, Choktanasiri W. Comparison of cryopreserved human sperm between ultra rapid freezing and slow programmable freezing: effect on motility, morphology and DNA integrity. *J Med Assoc Thai*. 2015;98(Suppl 4):S33-42.
99. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update* 2015;21(2):209-27.
100. Cartón-García F, Riesco MF, Cabrita E, Herráez MP, Robles V. Quantification of Lesions in Nuclear and Mitochondrial Genes of *Sparus aurata* Cryopreserved Sperm. *Aquaculture* 2013;402-403:106-12.