

Spermanın İşlenmesinde Kullanılan Kriyoprotektif Maddeler ve Kriyoprezervasyon

Metotları

Mehmet Ali ARSLANOĞLU¹, Nurdan COŞKUN ÇETİN^{2*}, Cengiz YILDIZ³

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı Hatay

²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı Hatay

³Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı Hatay

¹<https://orcid.org/0000-0001-6127-3991>

²<https://orcid.org/0000-0002-7120-8146>

³<https://orcid.org/0000-0002-9166-8836>

*Sorumlu yazar: nurdansknctn@gmail.com

Derleme

Makale Tarihçesi:

Geliş tarihi: 20.05.2023

Kabul tarihi: 26.02.2024

Online Yayınlanma: 10.06.2024

Anahtar Kelimeler

Kriyoprezervasyon

Sperm

Kriyoprotektanlar

Kriyohasar

Kriyoprezervasyon yöntemleri

ÖZ

Reprodüksiyon biyoteknolojisi hayvancılık alanında çok büyük öneme sahiptir. Biyoteknoloji başta suni tohumlama olmak üzere birçok alanda uygulama olanağı sağlamaktadır. En yaygın biyoteknoloji yöntemi, değerli erkek gamet hücrelerinin dondurulup, sonrasında suni yolla tohumlama işlemidir. Suni tohumlama ile istenen yönde genetik ıslah sağlanabilirken gereksiz erkek damızlık besleme külfetinin önüne geçilmiş olur. Spermanın dondurulması alanındaki önemli ilerlemeler gliserolün kriyoprotektif etkisinin keşfiyle başlamıştır. Kriyoprezervasyon yöntemi gelecekte kullanmak amacıyla, hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altında dondurularak biyolojik aktivitelerinin durdurulmasını ifade eder. Bu işlemde temel amaç, çok düşük sıcaklıklarda canlı hücre yada dokunun, en az hasarla ve fonksiyon kaybıyla uzun süreli saklanmasıdır. Gliserolün spermatozoonları dondurmanın zararlı etkilerine karşı koruyabildiği tesadüfen keşfedilmesinden sonra bilimsel ve modern anlamda ilk kez spermatozoon dondurma işlemi 1949'da Polge ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Spermatozoonun dondurulması işleminde kriyoprotektanlar ile dengelendikten sonra soğutma, sıvı nitrojen içinde depolama ve çözdüme işleminde kriyoprotektanların uzaklaştırılması ve en sonunda canlılığın devam etmesi sağlanmalıdır. Kriyoprezervasyon uygulamasında kullanılan kimyasallar, dondurma-çözme işlemi hücrenin canlılığını etkilemektedir. Dondurma işlemi sırasında kullanılan kriyoprotektanlar hücreyi dondurma hasarından korur ve yüksek oranda hidrojene bağlama özelliğine sahiptir. Kriyoprotektanlar ortamda donmamış fraksiyonu arttırarak ve iyon miktarını azaltarak etki ederler. Dondurma işlemleri sırasındaki dondurma hızı iyi ayarlanmalıdır. Yavaş soğutmada fazlaca buz kristali oluşmakta iken hızlı soğutmada buz kristalleri daha küçüktür. Bu derlemede kriyoprezervasyonda kullanılan kriyoprotektan maddeler, bazı kriyoprezervasyon teknikleri ile kriyoprezervasyonun spermatozoon üzerine etkilerinden bahsedilmiştir.

Cryoprotectant Substances Used in Sperm Processing and Cryopreservation Methods

Reviews

ABSTRACT

Article History:

Received: 20.05.2023

Accepted: 26.02.2024

Available online: 10.06.2024

Keywords:

Cryopreservation

Sperm

Cryoprotectants

Cryo-injury

Cryopreservation methods

Reproduction biotechnology is of great importance in the field of animal husbandry. Biotechnology provides application opportunities in many fields, especially artificial insemination. The most common biotechnology method is the freezing of valuable male gamete cells and then artificial insemination. While genetic breeding can be achieved in the desired direction with artificial insemination, unnecessary male breeder feeding burden is avoided. Important advances in the field of sperm freezing began with the discovery of the cryoprotective effect of glycerol. The cryopreservation method, for future use, refers to stopping the biological activities of cells and tissues by freezing them below zero degrees. The main purpose of this process is the long-term storage of living cells or tissue at very low temperatures with minimal damage and loss of function. After the accidental discovery that glycerol can protect sperm against the harmful effects of freezing, the first scientific and modern sense of sperm freezing was performed in 1949 by Polge et al. After the sperm cell is stabilized with cryoprotectants in the freezing process, the cryoprotectants should be removed in the cooling, storage and thawing process in liquid nitrogen and finally the continuation of vitality should be ensured. The chemicals used in cryopreservation and the freezing-thawing process affect the viability of the cell. Cryoprotectants used during the freezing process protect the cell from freezing damage and have high hydrogen bonding properties. Cryoprotectants act by increasing the unfrozen fraction and reducing the amount of ions in the medium. The freezing speed during freezing processes should be well adjusted. While more ice crystals are formed in slow cooling, ice crystals are smaller in fast cooling. In this review, cryoprotectant substances used in cryopreservation, some cryopreservation techniques and the effects of cryopreservation on spermatozoa are mentioned.

To Cite: Arslanoğlu MA, Coşkun Çetin N, Yıldız C., 2024. Spermmanın işlenmesinde kullanılan kriyoprotektif maddeler ve kriyoprezervasyon metotları. Kadırlı Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi, 4(2): 505-520.

Giriş

Reprodüksiyon biyoteknolojisi hayvancılık alanında büyük öneme sahiptir. Suni tohumlama, kriyoprezervasyon, *in vitro* fertilizasyon, gen transferi ve klonlama gibi birçok alanda biyoteknoloji kullanılmaktadır. Değerli erkek gamet hücrelerinin dondurulup suni tohumlamada kullanılması oldukça yaygın bir işlemdir. Bu sayede istenen yönde genetik ilerleme hızlıca sağlanabilir, erkek damızlık besleme zorluğunun önüne geçilmiş olur (Özkoca, 1984; Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Spermmanın dondurulması alanındaki önemli ilerlemeler gliserolün kriyoprotektif etkisinin keşfiyle başlamıştır (Brezina, 2018).

Spermmanın dondurulabilirliği ilk defa 1776'da Spallanzani tarafından çalışılmıştır. Spallanzani dondurulmuş çözdürülmüş spermada motilitenin bir süre korunduğunu gözlemlemiştir. Montegazza 1886'da ilk defa insanlarda spermatozoon dondurma fikrini ortaya atmıştır. Kriyohasarın 1940 yılında gliserol ile korunduğu keşfedildikten sonra insan spermasını kuru buz üzerinde saklama çalışmaları kaydedilmiştir. Gliserol ile insan spermatozoonunun dondurulması işlemi ilk defa 1949'da Polge ve arkadaşları tarafından başarılmıştır. Bunge ve Sherman tarafından 1953 yılında dondurma-çözdürme sonrası fertilizasyon ve embriyo gelişimi ilk defa bildirilmiştir. 1964 yılında dondurulmuş-çözdürülmüş insan spermatozoonundan ilk

canlı yavru doğmuştur. 1972’de ilk hücre dondurma bankası kurulmuş, dondurma-çözdürme sonrası sperma kullanılarak 1973’te ilk bebek dünyaya gelmiştir (Delilbaşı, 2008; Walters ve ark., 2009; Verheyen, 2010; Kadioğlu, 2011).

Kriyoprezervasyon; gelecekte kullanılması amacıyla, doku veya hücrelerin sıfır derecenin altında tüm biyolojik aktivitelerinin durdurulması olarak tanımlanabilir. Temel olarak, en az hasarla ve fonksiyon kaybı olmaksızın hücrenin uzun süreli saklanması amaçlanmaktadır (Bailey ve ark., 2000). Bilimsel ve modern anlamda ilk spermatozoon dondurma işlemi 1949’da Polge ve arkadaşları tarafından başarılmıştır (Polge ve ark., 1949). Spermatozoonun dondurulmasında kriyoprotektanlar ile dengeleme, soğutma, -196°C’da depolama ve kriyoprotektanların hücreden uzaklaştırılarak çödürülmesi adımları izlenmektedir (Gardner, 2007).

Özetle kriyoprezervasyonun aşamaları;

1. Kriyohasara karşı kriyoprotektan kullanılması
2. Dondurma
3. Saklama
4. Çözdürme
5. Kriyoprotektanların ortamdaki uzaklaştırılması

Kriyoprezervasyon uygulamasında kullanılan kimyasallar, dondurma-çözme işlemi hücrenin canlılığını etkilemektedir (Schroeder ve ark., 1990). Dondurma işlemi sırasında kullanılan kriyoprotektanlar yüksek oranda hidrojene bağlanma özelliğine sahiptirler. Kriyoprotektanlar ortamdaki donmamış fraksiyonu arttırarak ve iyon miktarını azaltarak koruyuculuk sağlamaktadırlar (Palasz ve Mapletopt, 1996). Kriyoprotektanlar hücre içerisine girerek (gliserol, DMSO, Propilen gikol vs.) meydana gelecek buz kristalleri oluşumunu -40°C’ye düşürürler. Hücre dışında etkili kriyoprotektanlar (monosakkaritler, disakkaritler ve trisakkaritler) zarı osmotik basınç değişimlerine karşı korurlar (Sanger ve ark., 1992).

Soğutma ve dondurma işlemleri sırasında -5°C ile -15°C’de buz kristalleri oluşur. Küçük kristaller, termodinamik olarak sabit değildirlir ve buz parçacıkları bir araya gelerek buz kristallerini meydana getirirler. Geriye kalan kısımda kriyoprotektif maddelerin miktarına bağlı olarak donmamış bir fraksiyon kalır. Bu kısımda şeker, tuz ve diğer kriyoprotektanların yoğunluğu artmakta ozmotik basınç yükselmektedir. Bu sayede su hücre dışına doğru çıkar ve ozmotik basınç dış ortamla eşitlenene kadar devam eder (Whoelders, 1997).

Bu derlemede kriyoprezervasyonda kullanılan kriyoprotektan maddeler, bazı kriyoprezervasyon teknikleri ile kriyoprezervasyonun spermatozoonlar üzerine etkilerinden bahsedilmiştir.

Kriyoprotektan Maddeler

Dondurma-çözdürme işlemlerinde sıcaklık değişimi ile ozmotik basınç ve kimyasal bileşimde oluşan değişikliklere karşı kriyoprotektan maddeler sulandırıcılara eklenerek spermatazoonları soğuk şokuna, hücre içi kristal oluşumuna, membran destabilizasyonuna karşı korumaktadır (İleri ve ark., 2000). Kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlığa sahip maddelerdir (Polge ve ark., 1949).

Permeable (Hücre İçine Girebilen) Kriyoprotektanlar

DMSO, gliserol, etilen glikol ve propilen glikol gibi permeable özellikli kriyoprotektanlar koruyucu etkilerini donma esnasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu ve ozmotik büzüşmeyi azaltarak göstermektedirler (Leeuw ve ark., 1993). Hücre içerisine giren kriyoprotektanlar membran lipidlerini ve proteinlerini yeniden düzenlerler. Membran akışkanlığını artırarak düşük sıcaklıkta dehidrasyonu uyararak hücrenin canlılığının korunmasını sağlarlar (Holt, 2000).

DMSO (Dimetilsülfoksit)

DMSO hem sıvı hem de organik sulandırıcılarda çözünme özelliğine sahiptir. Kriyoprotektanların toksik etkisini azaltmada maruz kalma süresinin kısaltılması veya nonpermeable kriyoprotektanların kullanımı denenebilir (Massip, 2001).

Gliserol

Türe bağlı olarak toksik etkisi değişmektedir. Gliserol hücrelerde membran destabilizasyonu ve ozmotik stres etkisi göstermektedir (Alvarenga ve ark., 2000; Woods ve ark., 2000).

Etilen Glikol

Etilen glikol kriyoprotektan maddeler içinde en az toksik etkiye sahip alkoldür (Aydiner, 2008; Şaylan, 2011). Birçok türde üreme hücrelerinin dondurma-çözdürme işlemi sırasında oluşan zararın etkisi, etilen glikol ve gliserolde benzerdir (Aydiner, 2008).

Propilen Glikol

Toksik özellikli olduğundan kullanımı sınırlıdır, yüksek konsantrasyonları önerilmemektedir (Şaylan, 2011).

Amid Türevi Kriyoprotektanlar

Bu maddelere örnek olarak formamid ve dimetilasetamid verilebilir. Aygırlarda spermanın dondurulmasında daha yaygın kullanılmaktadırlar. Sulandırıcıya %3,5-5 ilavesinin çözdürme sonrası spermatolojik kaliteye iyi geldiği kaydedilmiştir.

Nonpermeable (Hücre İçine Geçemeyen) Kriyoprotektanlar

Hücre içine giremeyen kriyoprotektanlar spermatozoonun plazma membranını geçemedikleri için hücre dışında etki gösterirler. Bu maddeler membranları ozmotik strese karşı daha esnek hale getirirler. Bu maddeler çözelti görevi görerek ortamın donma noktasını düşürürler (Amann, 1999). Ayrıca dondurma-çözdürme sonrası lipid peroksidasyonunu azalttığı saptanmıştır (Arav ve ark., 1993; Cabria ve ark., 2001).

Makromoleküller

Kriyoprezervasyonda yaygın olarak polietilen glikol, ficoll 70, bovine serum albümin, dekstran, mannitol, polivinil alkol, antifriz protein, polivinilil providon ve diğer polimerler kullanılmaktadır (Kasai, 1996; Mcgann, 1999; Cabria ve ark., 2001; Şaylan 2011).

Sakkaritler

Hücre içi kristalleşmeyi önlemek için hücrede sıvı kaybı oluşturarak etki ederler (Rudolph ve Crowe, 1985; An ve ark., 2000). Dondurma ve çözdürme sırasında şekillenen membran zararına karşı membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girerek yüzey artışı sağlamaktadırlar. Ayrıca sakkaritler çözdürme işlemi sırasında hücrelerin ozmotik şoka girmesini de önlemektedir (Mcgann, 1999). Sperma sulandırıcılarına katılan şekerler enerji verici faydalı etkiye de sahiplerdir (Panyaboriban ve ark., 2015).

Yumurta Sarısı ve Süt

Yumurta sarısı fosfolipitleri hücrenin yüzeyine bağlanarak ve adenilat siklazı aktive ederek koruyucu etki göstermektedir (Holt, 2000). Hayvan türüne göre etkili fosfolipit kaynakları araştırılmıştır (Leeuw ve ark., 1993). Hayvansal kaynaklı yumurta sarısı ve sütte kontaminasyon riski bulunmaktadır. Spermatozoon enerji kaynağı glukoz ya da fruktoz oluşturur. Sulandırıcılarda tampon etkili sitrat, tris, fosfat ve sitrik asit gibi maddeler eklenmektedir. Bakterilere karşı hayvansal kaynaklı olmayan apatojen steril ürünler veya SPF (Specific Patogen Free) yumurta sarısının kullanılması ile daha iyi sonuçlar alınmaktadır (Thibier ve Guerine, 2000).

Diğer Kriyoprotektif Ajanlar

Soya fasülyesi, pentoksifylline, kafeine, sodyum nitroprusside, platelet aktivasyon faktörü ve hyaluronik asit gibi maddeler çözündürme sonrası spermatozoon canlılığında artış sağlamaktadırlar (Holt, 2000; Oehninger ve ark., 2000; Tsutsui ve ark., 2000). Son yıllarda spermatozoon membranında transport işlevi gören aquaporin adı verilen protein yapılı bileşiğin spermatozoon dondurma medyumuna eklenmesi çözündürme sonrası canlılıkta artış sağlamıştır (Edashige ve ark., 2003).

Kriyoprezervasyon Hasarları

Dondurma işlemi esnasında hücre içi buz oluşumu, dehidratasyon, pH değişiklikleri, protein denatürasyonu gibi olaylar yaşanmaktadır. Ani sıcaklık azalması membran geçirgenliği ve hücre iskelet yapısında değişimler oluşturur (Elder ve Dale, 2014). Buz kristalleri, hücre membranlarında büyük hasarlara sebep olmaktadır. Sulandırıcılara kriyoprotektif madde eklenmediği takdirde pH değişiklikleri ve farklı konsantrasyonlarda tuz etkisi hücrenin ölümüne sebep olacaktır. Lipoprotein denatürasyonu ve buna bağlı membran yapısında bozulmalar kaçınılmazdır. Kriyoprotektan solüsyonu içindeki tuz konsantrasyonunun artması ile su kaybı, dehidrasyon ve büzüşme yaşanır. Hücredeki bu hasarların şiddetine bağlı olarak geri dönüşümü olmayan durumlar ortaya çıkabilmektedir (Tablo 2).

Kriyoprezervasyon uygulamasında hücrenin hızlı bir şekilde aniden dondurulmasıyla, hücre dışına su aktarımı da hızlı ve fazla olacağından hücre zarında ozmotik hasar meydana gelmektedir, çözündürme işlemi yavaş yapılırsa bu defa hücre içi buz kristalleri birbirleriyle birleşip büyüyebilir ve yine hücre zarında hasar meydana gelir. Bu sebeple uygulama sırasında yavaş dondurma ve hızlı çözündürme önemlidir (Alberts ve ark., 2008).

Dondurma işleminde buz kristallerinden kaynaklanan yapısal hasarlar yanında oksidatif stres ile ilişkili reaktif oksijen radikallerinden kaynaklanan hasarlar da oldukça önemlidir. Bununla birlikte dondurma hasarı membran, organel hasarı ve DNA bütünlüğünün bozulması (DNA Fragmantasyonu) şeklinde de karşımıza çıkmaktadır (Tablo 1). Dondurma-çözündürme sonrası %30-50 oranında hücre hasarı gözlenmektedir (Paoli ve ark., 2014). Dondurma işleminde bakteriyel, viral veya mantar enfeksiyonları gözlenebilir (De Lamirande ve ark., 1997). Bazı araştırmacılar katalaz, askorbik asit, E vitamini ilavesini önermektedirler (Askari ve ark., 1994).

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. Dimetil sülfoksit: Kromatin hasarına neden olur. DNA metilasyonu, DNA ve kromatinde yapı değişikliklerine neden olur. Propilen Glikol: DNA metilasyonunu artırır. Gliserol: DNA'nın konformasyonunu değiştirir, istikrarı bozucu bir etkiye sahiptir, DNA'nın termal stabilitesini baskılar.
Osmotik stres	Kromatin gevşemesine, kromozomal sapmalara, DNA çift zincir kırıklarına ve sonuçta DNA fragmentasyonunda artışa neden olur. Proteinlerin yanlış katlanmasına neden olur.
Sıcaklık	Soğuk denatürasyonuna (protein polar olmayan grupların su ile, çok spesifik ve kuvvetli sıcaklığa bağlı etkileşimi) neden olur. Mutasyonları indükler.
Ph	Deaminasyon (bir molekülden bir amin grubunun çıkarılması), Depürinasyon (DNA'daki pürin dükleotidinin fizyolojik sıcaklıklarda n-glikozid bağının kırılması)'a neden olur. Aşırı yüksek veya düşük pH, DNA sarmalını dengesizleştirir ve erime noktasını değiştirir.
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.

Farklı maturasyon evresindeki spermatozoonlar farklı kriyobiyolojik özellikler gösterirler ve farklı dondurma çözme yöntemleri gerekli görülmektedir. Örnek olarak ejakülatın dondurma ve çözme hassasiyeti epididimal spermatozoon ve testiküler spermatozoonlardan daha yüksektir (De Lamirande ve ark., 1997).

Kriyoprezervasyonda Kullanılan Teknikler

Dondurma işlemleri sırasındaki uygulanacak dondurma hızı hücrelerin özelliğine uygun olmalıdır. Hızlı dondurma ve yavaş dondurma protokollerinin en önemli farkı kriyoprotektan maddelerin konsantrasyonlarıdır (Gardner, 2007).

Klasik Yavaş Dondurma

Genellikle embriyo ve oosit dondurmada yavaş dondurma tercih edilmektedir. Genel olarak;

- 1- Kriyoprotektan ilavesi
- 2- Dondurma alanına hücrelerin alınması
- 3- Dondurma makinesine nakil
- 4- Kristalizasyon (seeding) işlemi

- 5- Yavaş olarak soğutma
- 6- Sıvı azot içine alınması
- 7- Çözdürme ve kriyoprotektanın uzaklaştırılması

Tablo 2. Kriyoprezervasyonda dondurma-çözdürme işleminin etkileri (Yeste, 2016'ya göre oluşturulmuştur).

Plazma membran üzerine etkisi; Membran destabilizasyonu, sıvı durumda jel faza geçiş, iyon kanallarında fonksiyon kaybı oluşur, seçici geçirgenlik kaybı meydana gelir.

Sperm nükleusu üzerine etkisi; Protamin ve bazı histonların çekirdeklerindeki yer dağılımında değişiklikler meydana gelir. Protamin sistein köprülerinde hasarlar şekillenir, DNA fragmentasyonu, fertilizasyon ve erken embriyo gelişiminde rol oynayan önemli genlerde lezyonlar oluşur.

Perinükleer tekaya etkisi; Hücre iskeleti elemanlarında hasarlar, sperm çekirdeği decondensasyonu.

Mitokondriyal fonksiyon ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine etkisi; ROS seviyesinde artış olurken, mitokondriyal seviyede düşüş meydana gelir.

Sperm vakuollerine etkisi; Sperm nükleer vakuolizasyonunda artış meydana gelir.

Sperm proteinlerinin seviyeleri, yerleri, fonksiyonları ve trozin fosforilasyonuna etkisi; Sperma protein seviyesinde artış ya da azalışlar meydana gelir. Yerleşiminde değişimler oluşur, iyon kanalları fonksiyonlarına etkileri, trozin fonksiyonunda değişiklikler şekillenir.

mRNA ve mikroRNA'lar üzerine etkisi; Fertilizasyon ve doğum başarısı ile ilgili mRNA'larda azalma, bazı mikroRNA seviyelerinde değişim meydana gelir.

Parental epigenetik düzenleme üzerine etkisi; Şimdiye kadar elde edilen verilere göre sperm kriyoprezervasyonu gen baskılama açısından güvenlidir.

Sperm hareketliliği üzerine etkisi; Sperm hareketliliğinde azalma meydana gelir.

Buz oluşumunu engellemek ve dondurma zararını azaltmak amacıyla hücreler dehidre edilmelidir (Shaw ve ark., 2000). Kriyoprotektan sulandırıcılara eklendikten sonra belli süre dengelenmeye bırakılırlar ve ekstraselüler ortam hiperozmotik olduğundan hücre su kaybetmeye başlar. Hücre dışına su çıkışı ve hücre içine kriyoprotektan girişi dengelendiğinde büzüşmesi sona erer (Fahning ve Garcia, 1992).

Dondurma makinesi kullanılarak 0°C'nin altında kontrollü buz oluşumu uyarılmaktadır. Dondurma işlemi yavaş olduğunda suyun hücre içinde donması engellenmektedir. Seeding işleminde, plazma membranının koruyucu etkisinden dolayı hücre dışı ortam daha önce donmaya başlar. Hücre içi su hücre dışına çıkarak burada donmaya başlar (Gao ve Critser, 2000; Shaw ve ark., 2000). Donma işlemi esnasında hücre içinde donmadan kalan sıvıda konsantrasyon artışı olmaktadır (Pegg, 2000). Artan elektrolit konsantrasyonu membranda destabilizasyona neden olur. Fare oositlerinde yapılan çalışmalarda intraselüler buz kristallerinin oluşumunun engellenmesinde suyun %90'ının kaybedilmesi gerektiği bildirilmiştir bu oran embriyo dondurulmasında %30'dur (Friedler ve ark., 1988).

Soğutma çok yavaş yapıldığında buz kristallerinin oluşumuna bağlı olarak eriyik konsantrasyonu artmaktadır (Gao ve Critser, 2000). Membran yapısı, hücre plazma membranının suya ve kriyoprotektana karşı ısıya bağımlı geçirgenliği ve yüzey/hacim oranı dondurulma işleminde önemli faktörlerdendir (Agca, 2000).

Ultra Hızlı Dondurma

Hızlı dondurma, kısmen dehidre edilmiş hücrelerin yaklaşık 1200-1250°C/dk hızında soğutulmuş olarak dondurulmasını ifade etmektedir (Trounson ve Sjöblom, 1988). Bu teknikte hücre zarından geçebilen ve geçemeyen kriyoprotektanlar birlikte eklenirler. Hücreler kısa bir dengeleme süresi sonrası soğutulur ve sıvı nitrojen buharında bekletildikten sonra tanka alınmaktadır. Bu yöntem klasik dondurma ve vitrifikasyona kıyasla daha düşük canlılık oranına sahiptir (Trounson, 1990).

Vitrifikasyon

Vitrifikasyon ekonomik ve pratik bir yöntemdir. Embriyo dondurma süresi ve dondurma esnasında buz kristali miktarının az olması, yüksek başarı nedeniyle tercih edilmektedir. Vitrifikasyon, buz kristali oluşmaksızın bir sıvının aşırı soğuma sonucu yoğunluk artışına bağlı cam benzeri hal almasıdır. Bu işlemde yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan, yüksek soğutma ve ısıtma oranları uygulanarak hücre içi ve dışının eş zamanlı soğuması gerçekleşir (Sutton, 1991; Vajta, 2000). Bu teknikte +15 ile -5 °C arasındaki ısılar çok hızlı olarak geçilmektedir (Vajta, 2000).

Vitrifikasyonda ihtiyaç duyulan katkı maddelerinin yüksek konsantrasyonları potansiyel sitotoksik etkilidir (Kasai, 1996).

Yukarıda sayılan yöntemler dışında sıvı azotsuz -130°C altında buzdolapları ve dondurucularda saklanma yöntemi uygulanmakta, hücre kayıplarının çok önemli olmadığı bazı memeli hücre kültürlerinde ve mikrobik süspansiyonlarda kullanılabilir (Özkavukçu ve Erdemli, 2002).

Liyofilizasyon

Liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yöntemi, biyolojik materyalin dondurulup, düşük basınç altında buzun sıvı hale geçmeden uzaklaşması ile su miktarının herhangi bir metabolik reaksiyonu desteklemeyecek seviyeye kadar azaltılması olarak tanımlanmaktadır. Liyofilize örnekler oda sıcaklığında veya +4°C'de daha az maliyetle muhafaza edilmekte ve taşınması mümkün olmaktadır (Krokida ve ark., 1998; Yöney, 2005). Günümüzde bu metot özellikle gıda

ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Spermatozoon liyofilizasyonunda, Wakayama ve Yanagimachi (1998) yaptıkları çalışmada, liyofilize fare spermatozoonlarının hareketsiz, ölü olduklarını fakat DNA'larının bozulmadığını fark etmişler ve intra-sitoplazmik spermatozoon enjeksiyonu yöntemiyle fertilizasyon sonrasında yavru alınabileceğini göstermişlerdir. Liyofilizasyon sulandırıcısı olarak, fetal sıgır serumu, monosakkarit veya disakkaritler, L-glutamin, sodyum pürivat, EDTA, esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler ve antibiyotikler gibi çeşitli tampon, besin ve koruyucu madde bileşiklerinin eklendiği ticari kültür sulandırıcıları (TCM-199, DMEM, TRIS) kullanılabilir.

Genel olarak bu işlemden önce dondurma, esas kurutma ve son kurutma işlem basamakları bulunmaktadır. Dondurulmuş sperma örnekleri -30°C - -80°C 'de liyofilizatör içerisine yerleştirilerek esas kurutma işlemine geçilir. Kademeli olarak sıcaklık artışı ve basıncın düşürülmesi ile spermadaki suyun yaklaşık %90'ı sıvı süblimasyona uğrayarak uzaklaştırılmaktadır. Liyofilize sperma vakumlu tüplerde muhafaza edilmektedir, oda sıcaklığında veya $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanabileceği gibi daha uzun süre muhafaza için -20°C 'de veya -80°C 'de saklanabilir (Kawase ve ark., 2005; Arav ve Saragusty, 2016).

Çözdürme Sonrası Spema Kalitesinin Değerlendirilmesi

Spermanın dondurulması ve çözündürülmesi sırasında sıcaklık ve osmotik değişimler, membran hasarlarına sebep olarak viabilite ve fertilizasyon yeteneği azalmaktadır (Correa ve Zavos, 1995; Coorea ve ark., 1997; Yavaca ve ark., 1999; Zeng ve Terada, 2001). Boğa spermasının çözündürülmesi işlemi su banyosu içerisinde $33-35^{\circ}\text{C}$ de 30-40 saniye süreli yapılmaktadır (De Jarnette ve ark., 2000; De Jarnette ve Marshall, 2005). 0,25'lik payette dondurulan boğa spermasının 37°C de 30 saniyede çözündürülmesinin uygun olduğu bildirilmiştir (Underwood ve ark., 2010).

Hayvansal üretimde sperma kalitesinin fertilité ile ilişkisi büyük önem taşımaktadır. Sperma kalitesinin belirlenmesinde çeşitli testler uygulanmaktadır (Clement ve ark., 2001). Çözdürme sonrası çekirdek, akrozom, kuyruk, mitokondri ve plazma membranı değerlendirmeye gerek duyulan en önemli bölgelerdir (Graham ve Moce, 2005). Plazma membran bütünlüğünün değerlendirilmesinde oldukça çeşitli laboratuvar prosedürleri bulunmaktadır. Eozin boyama, hipoozmotik şişme testi (HOST) membran bütünlüğünün değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Davies-Morel, 1999). Rutin spermatolojik testlerin yanında DNA kalitesi, enzimatik aktivite, ozmotik stres ve inkübasyon testleri, arttırılmış akrozom reaksiyon oranı, mukus veya jel penetrasyon testi, hamster oosit

penetrasyon testi ve heterospermik tohumlama testleri de kullanılmaktadır (Foote, 2001). Fonksiyonel bölgelerin aktivitelerinin değerlendirilmesinde floresan boyalar ile mitokondriyal - akrozomal boyaların kombinasyonları tercih edilebilmektedir (Kavak ve ark., 2003). CASA (computer asisted semen analyzer) sistemi sperma kalitesi yönünden detaylı bilgi vermektedir (Garner ve ark., 1994). DNA hasarlarının tespiti ile erken embriyonik ölümlerin tespit edilmesi kolaylaşabilmektedir. Biyokimyasal bazı belirteçler ile spermatozoon fonksiyonlarının ve DNA hasarının belirlenmesine yönelik çalışmalar da yapılmıştır (Evenson ve ark., 1995).

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Kaynaklar

- Agca Y., 2000. Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue. *Ilar*, 41(4): 207-220,
- Alberts B, Johnson A, Lewis, J, Raff M, Roberts, K, Walter P., 2008. Hücrenin moleküler biyolojisi. TÜBA yayınları, Çev. Ankara: Garland Science.
- Alvarenga MA, Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM., 2000. Acrozomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Equine Vet J*, 32: 541-545.
- Amann R, 1999. Cryopreservation of sperm In: Knobil E, Neill JD (eds) *Encyclopedia of Reproduction*.
- An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Takashi M., 2000. Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 40: 237-249.
- Arav A, Hehu D, Mattioli M., 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fertil*, 99: 353-358.
- Arav A, Saragusty J., 2016. Directional freezing of sperm and associated derived technologies. *Animal Reproduction Science*, 169: 6–13.
- Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A., 1994. Effect of natural antioxydants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freez thaw process. *Arch Androl*, 33: 11-15.

Aydiner F., 2008. Sperm kriyoprezervasyonu sonrasında apoptozun değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N., 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: Acrosome damage and capacitation phenomenon. *J. Androl*, 21: 1-7.

Brezina PR., 2018. Fertility preservation for social and oncofertility indications. *Minerva Endocrinol*, 43: 69-79.

Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK, 1954. Clinical use of frozen semen; report of four cases. *Fertil Steril*, 5: 520-9.

Cabria E, Anel L, Herraiz MP., 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 52: 623-635.

Clement F, Ladonnet Y, Magistrini M., 2001. Sperm morphology and fertility. *Animal Reprod.*, 68: 362-363.

Correa JR, Pace MM, Zavos PM., 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*. 48: 721-731

Correa JR, Zavos PM., 1995. Frozen-thawed bovine spermatozoa diluted by slow or rapid dilution method: measurements on occurrence of osmotic shock and sperm viability. *Theriogenology*. 44: 963-971.

Davies-Morel MCG., 1999. Equine artificial insemination. p: 416. CAB International, Wallingford, UK.

De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology”, *Rev Reprod*, 2(1): 48-54.

DeJarnette JM, Barnes DA, Marshall CE., 2000. Effects of pre-and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology*, 53(6): 1225-1238.

DeJarnette JM, Marshall CE., 2005. Straw-thawing method interacts with sire and extender to influence sperm motility and conception rates of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(11): 3868-3875.

Delilbaşı L., 2008. A'dan Z'ye tüp bebek laboratuvar. İstanbul, Veri Medikal Yayıncılık, 229-258.

Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M., 2003. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biol. Reprod*, 68: 87-94.

Elder K, Dale B., 2014. İn-vitro fertilizasyon. T. İrez, Çev. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Evenson DP, Sailer BL, Jost LK., 1995. Relationship between stallion sperm deoxyribonucleic acid (DNA) susceptibility to denaturation in situ and presence of DNA strand breaks: implications for fertility and embryo viability. *Biol. Reprod. Mono*, 6: 655-659.

Fahning ML, Garcia MA., 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*, 29: 1-8.

Foote RH., 2001. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Sci*, Volume 80, Electronic Supplement 2. Per-reviewed papers from the ASAS National Meeting.

Friedler S, Gırdıce IC, Lamb EJ., 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril*, 49(5): 743-764.

Gao D, Critser JK., 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Ilar*, 41(4): 187-196.

Gardner DK., 2007. In vitro fertilization- a practical approach. Informa healthcare [İn Vitro Fertilizasyon- Pratik Yaklaşım, Sağlık]. New York, London.

Garner DL, Thomas CA, Gravance CG., 1994. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reproduction Domestic Animals*, 34: 399-404.

Graham JK, Moce E., 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64: 492-504.

Hafez E., 1993. *Reproduction in farm animals*. '6th edition, Philadelphia, 330-343, 405-423.

Holt WT., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62: 3-22.

İleri IK, AK , Pabuççuoğlu S, Birlir S., 2000. Reprodüksiyon ve suni tohumlama, *Ders Notu*, 59, p: 75-90, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul.

Kadıoğlu A., 2011. *Who Laboratuvar El Kitabı '5. Basım'*, İstanbul, Nobel Yayıncılık, 169-176.

Kasai M., 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci*, 42: 67-75.

Kavak A, Johannisson A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Aydın M., 2003. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci*, 76: 205-216.

Kawase Y, Araya H, Kamada N, Jishage K, Suzuki H., 2005. Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 72(3): 568-573.

Krokida MK, Karathanos VT, Maroulis ZB., 1998. Effect of freeze-drying conditions on shrinkage and porosity of de-hydrated agricultural products. *Journal of Food Engineering*, 35(4): 369-380.

Leeuw FED, Leeuw AMD, Daas JHG, Colenbrander BV., 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30: 32-44.

Massip A., 2001. Cryopreservation of embryos of farm animal. *Reprod Dom Anim*, 36: 49-55.

Mcgann LE., 1999. Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology*, 15: 382-390.

Oehninger S, Duru NK, Srisombut C, Morshedi M., 2000. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol*, 169: 3-10.

Özkavukçu S, Erdemli E., 2002. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*, 24(4): 187-196.

Özkoca A., 1984. Çiftlik hayvanlarında reproduksiyon ve sun'i tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, İstanbul.

Palasz AT, Mapletopt RJ., 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv*, 14: 127-149.

Panyaboriban S, Suwimonteerabutr J, Phutikanit N, Swangchan-Uthai T, Tharasanit T, Techakumphu M., 2015. Effect of various combinations of sugar supplementation in the extender on frozen-thawed ram semen quality and fertility. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 45(2): 229.

Paoli D, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L., 2014. Sperm cryopreservation: Effects on chromatin structure. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 20(1): 5-13.

Pegg DE., 2000. The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med*, 20(1): 5-13.

Polge C, Smith AU, Parkes AS., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172): 666.

Rudolph AS, Crowe JH, 1985. Membrane stabilization during: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, 22: 367-377.

Sanger WG, Olson JH, Sherman JK., 1992. Semen cryobanking for men with cancer-criteria change. *Fertil Steril*. 58(5): 1024-1027.

Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE, Eppig JJ., 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. *J Reprod Fert*, 89: 43-50.

- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO., 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53: 59-72.
- Sutton RL., 1991. Critical cooling rates to avoid ice crystallization in aqueous cryoprotectant solutions containing polymers. *J. Chem. Soc. Faraday trans*, 87(23): 3747-3751.
- Şaylan A., 2011. Kadın gamet hücresinde optimal vitrifikasyon araştırması, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- Thibier M, Guerin B., 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for animal insemination. *Anim Reprod Sci*, 62: 233-251.
- Trounson A, Sjöblom P., 1988. Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. *Fertility and Sterility*, 50(2): 373-376.
- Trounson AO., 1990. Cryopreservation. *Br. Med. Bull*, 46(3): 695-708.
- Tsutsui T, Hase M, Hori T, Ito T., 2000. Effects of orvus es paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing. *Vet Med Sci*, 62: 533-535.
- Underwood SL, Bathgate R, Pereira DC, Castro A, Thomson PC, Maxwell WMC, Evans G., 2010. Embryo production after in vitro fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Theriogenology*, 73(1): 97-102.
- Vajta G., 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci*, 621: 357-364.
- Verheyen G., 2010. Outcomes, safety and effectiveness for cryopreservation of ejaculated, testicular and epididymal sperm. ALPHA Conference Budapest 30th April-2nd May.
- Wakayama T, Yanagimachi R., 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature Biotechnology*, 16(7): 639-641.
- Walters EM, Benson JD, Woods EJ, Critser JK., 2009. Sperm banking: Theory and practice. The history of sperm cryopreservation. Cambridge University Press. Edited by Pacey AA. and Tomlinson M., 1-10.
- Whoelders H., 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, 19: 135-138.
- Woods EJ, Gilmore JA, Liu J., 2000. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod*, 15: 335-343.
- Yavasca I, Ak K, Ileri IK., 1999. Einwirkungen verschiedener umgebungsterperaturen und besamungszeiten auf die fertilität der nach paillettenverfahren tiefgefrorenen und aufgetauten bullenspermien (in German). *J Fac Vet Med Istanbul Univ*. 25: 215-223.

Yeste M., 2016. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1): 47-64.

Yöney T., 2005. Gıdaları dondurarak kurutup saklamak nasıl çalışır? *Bilim Teknik Dergisi*, 12: 101.

Zeng WX, Terada T., 2001. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*, 55: 615-627.