

T.C
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI



**FARE SPERMINİN DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE STANDART
RAFFİNOZ + YAĞSIZ SÜT TOZU SULANDIRICISINA EKLENEN
DÜŞÜK DOZDA DİMETİL SÜLFOKSİTİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Mehmet Ali ARSLANOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Cengiz YILDIZ

HATAY-2022

T.C
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNI TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

**FARE SPERMINİN DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE STANDART
RAFFİNOZ + YAĞSIZ SÜT TOZU SULANDIRICISINA EKLENEN
DÜŞÜK DOZDA DİMETİL SÜLFOKSİTİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Mehmet Ali ARSLANOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Cengiz YILDIZ

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
20.YL.049 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2022

T.C
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

**FARE SPERMINİN DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE STANDART
RAFFİNOZ + YAĞSIZ SÜT TOZU SULANDIRICISINA EKLENEN
DÜŞÜK DOZDA DİMETİL SÜLFOKSİTİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Mehmet Ali ARSLANOĞLU

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 16/05/2022 tarihinde sözlü yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi **Jüri Başkanı:** Prof. Dr. Cengiz YILDIZ

Üye: Prof. Dr. Melih AKSOY

Üye: Prof. Dr. İlker YAVAŞ

Bu tez, Enstitümüz Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

16/05/2022

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve tez çalışmam boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen, her zaman yapıcı ve destekleyici olan, doğru bilgiye ulaşmama yardımcı olan Prof. Dr. Cengiz YILDIZ hocama teşekkür ederim.

Jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren Prof. Dr. Cengiz YILDIZ, Prof. Dr. Melih AKSOY, Prof. Dr. İlker YAVAŞ hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmam süresince desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Fikret KARACA hocama teşekkür ederim.

Tez çalışmama yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Nurdan COŞKUN ÇETİN ve Arş. Gör. Oğuz Kaan YALÇIN hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmama yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Firdevs YILMAZ ve Sinan ÇINAR'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her anlamda yanımda olup destek veren Aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGE VE KISALTMALAR	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT.....	XI
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Önem.....	3
2.2.Spermatozoon Kriyoprezervasyonu.....	3
2.4.Kriyoprotektanlar.....	5
2.6. Kriyoprezervasyon Hasarları	10
2.7.Fare Spermatozoonları Üzerine Yapılan Araştırmalar	14
3.GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1.Gereç	17
3.2.Yöntem.....	17
3.2.1.Sperma sulandırıcılarının hazırlanması	17
3.2.2. Spermanın Alınması ve Sulandırılması	19
3.2.3. Spermatozoonların donduma işlemi	21
3.2.4. Payetlerin çözündürülmesi	22
3.2.5. Taze ve donmuş-çözülmüş spermatozoon muayenesi.....	22
3.2.6. Motilite Dayanıklılık Testi (Longevity)	26
3.2.7.İstatistik	26
4.BULGULAR.....	27
4.1. Çalışma Gruplarında Dondurma Çözdürme Sonrası Spermatolojik Bulgular.....	27
4.1.1. Motilite Değerleri	27
4.1.2. Ölü Spermatozoon Oranı	28
4.1.3. Akrozom Hasarı.....	28
4.1.4. Membran Bütünlüğü Değerleri (HOS+).....	29
4.1.5. Motilite Dayanıklılık (Longevite) Değerleri	29

5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ	35
7. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 1. Standart sperma sulandırıcısı (%18 Rafinoz + %3 yağsız Süt tozu)'nın işlem öncesi ve sonrasındaki görünümü a (santrifüjden önce), b (yetersiz santrifüj), c (yeterli santrifüj).....	19
Şekil 3. 2. a (CD-1 ırkı farelerin zapturaptı) ve b (IP (Intraperitoneal) olarak anestezi altına alınma bölgesi).	20
Şekil 3. 3. Stereo mikroskop(Euromex/ Nexius Zoom) ve stereo mikroskop kullanılarak epididimal dokudaki spermatozoonları doku dışına çıkarım işlemi.....	21
Şekil 3. 4.Dondurulmuş sperma örneklerinin saklandığı sıvı azot tankı.	21
Şekil 3. 5. Eozin-Nigrosin boyama yöntemi sonucu baş bütünlüğü bozulmuş (A), Ölü sperma(B), canlı sperma(C).....	23
Şekil 3. 6. Hipoozmotik şişme test solüsyonuna spermaların verdiği reaksiyonların mikroskop altındaki görünümü. A) HOS- herhangi bir değişiklik yok, B) HOS+ kuyruğunda kıvrılma ve baş kısmında şişme var.	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge2. 1. Kriyoprezervasyon Dondurma-Çözme İşlemi Etkileri.....	11
Çizelge2. 2. Kriyoprotektan Ajanların Spermatozoon Üzerine Etkileri.	13
Çizelge2. 3 Fare Sperm Kriyoprezervasyonu Üzerine Yapılmış Önemli Çalışmalar	15
Çizelge3. 1. Human tubul fluid (HTF)	18
Çizelge3. 2. Hancock solüsyonu.....	25
Çizelge4. 1. Çalışma gruplarında dondurma çözme sonrası spermatolojik bulgular.	27
Çizelge4. 2. Zamana göre motilite dayanıklılık değerleri.	30



SİMGE VE KISALTMALAR

BSA	Bovine serum Albumin
C/OH	Carbon/Hidroksil
CPA	Cryoprotectant Agents
Dk	Dakika
DMA	Dimetil Asetamid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EG	Etilen Glikol
HOS	Hipoosmotik Şişme
HTF	Human Tubul Fluid
M	Molar
mRNA	Messenger Ribo Nükleik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
°C	Santigrat derece
OH	Hidroksil
PAF	Platelet Activation Factor
pH	Potansiyel Hidrojen
PrOH	Propilen Glikol
RNA	Ribo Nükleik Asit

ROS Reaktif Oksijen Türleri

< Küçüktür işareti

> Büyüktür işareti

± Artı eksi işareti

μl Mikrolitre

ml Mil ilitre

° Derece

% Yüzde işareti

ÖZET

Fare Sperminin Dondurulabilirliği Üzerine Standart Raffinoz + Yağsız Süt Tozu Sulandırıcısına Eklenen Düşük Dozda Dimetil Sülfoksitin Etkisi

Sunulan çalışma, fare sperminin başarılı olarak dondurulabilmesi için standart raffinoz + yağsız süt tozu sulandırıcısına eklenen düşük dozda dimetil sülfoksit (DMSO) oranlarının çözüm sonrası sperm kalite parametreleri üzerine etkilerini ortaya koymak için dizayn edilmiştir. Araştırma 12-24 haftalık yaşta 40 adet CD-1 ırkı erkek fareler üzerinde yürütülmüştür. Farelerden cerrahi yöntem ile diseke edilerek elde edilen cauda epididimislerdeki spermatozoonlar kullanılmıştır. Çalışmada %18 raffinoz + %3 yağsız süt tozu içeren standart sperm sulandırıcısına 0.25M, 0.5M, 1M ve 1.5 Molar oranlarında ayrı ayrı DMSO eklenmiştir. DMSO ilavesiz %18 Raffinoz + %3 yağsız süt tozu kombinasyonu kontrol olarak tutulmuştur. Dondurma işlemi sıvı azot kullanılarak 0.25ml'lik payetlerde yapılmış ve ardından çözündürme işlemi ise 37 °C'lik su banyosunda 30 saniyede gerçekleştirilmiştir. Çözüm sonrası sperm örneklerinin motilite, ölü-canlı, akrozom, membran bütünlüğü (HOST: Hiper ozmotik şişme testi) ve HTF (Human Tubal Fluid) içerisinde 4 saat süresince motilite dayanıklılık testleri yapılmıştır.

Dondurup çözündürme sonrası gruplar arası değerlendirmede en yüksek motilite değerleri 40.0 ± 2.88 ile 0.5 M DMSO grubunda bulunmuştur. Motilite açısından Kontrol, 0.25 M ve 0.5 M DMSO grupları arasında önemli istatistiki bir fark bulunmazken ($p > 0.05$), bu gruplar ile 1 M ve 1.5 M DMSO grupları arasında önemli farklar bulunmuştur ($p < 0.05$). Dondurup çözündürme sonrası en düşük ölü spermatozoon oranı ise 38.4 ± 2.42 ile 0.5 M DMSO grubunda tespit edilmiştir. Canlı spermatozoon oranı açısından 0.25 M ve 0.5 M DMSO grupları Kontrol grubuna göre daha iyi bulunmuştur ($p < 0.05$). Çözüm sonrası gruplar arası en yüksek membran bütünlüğü değeri 62.8 ± 2.17 ile 0.5 M DMSO grubunda saptanmıştır. Membran bütünlüğü açısından 0.5 M DMSO grubunun Kontrol grubun'dan daha iyi olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Gruplar arası değerlendirmede dondurup çözündürme sonrası en düşük akrozom hasarı oranı ise 8.6 ± 0.85 ile 0.25 M DMSO grubunda tespit edilmiştir. Akrozom hasarı açısından kontrol grubu ile deneme grupları arasında, 1.5 M DMSO grubu hariç ($p < 0.05$), istatistiki bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Çalışmada dondurma ve çözündürme sonrası bir'er saatlik zaman aralığında gerçekleştirilen motilite dayanıklılık (longevity) testin 'de 3. saate'e kadar motilite oranlarında en iyi sonuç 0.5 M DMSO grubu olmuş ($p < 0.05$), ve 4. saatte tüm gruplarda motilite değeri saptanmamıştır. Sonuç olarak, Fare sperminin dondurulabilirliği üzerine standart raffinoz + yağsız süt tozu sulandırıcısına 0.5 M DMSO ilavesinin çözüm sonrası sperm kalite parametrelerini geliştirdiği ve başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Fare, spermatozoon, dondurma, DMSO.

ABSTRACT

Effect of Low-Dose Dimethyl Sulfoxide Added to Standard Raffinose + Skimmed Milk Powder Extender on Cryopreservation of Mouse Sperm

The present study was designed to reveal the effects of low dose dimethyl sulfoxide (DMSO) ratios added to standard raffinose + skimmed milk powder extender on post-thaw sperm quality parameters for successful freezing of mouse sperm. The study was carried out on 40 male CD-1 mice aged 12-24 weeks. Sperm from cauda epididymis obtained by surgical dissection from mice were used. In the study, DMSO was added separately at 0.25M, 0.5M, 0.1M and 1.5 Molar ratios to the standard sperm extender containing 18% raffinose + 3% skimmed milk powder. The combination of 18% Raffinose + 3% skimmed milk powder without DMSO was kept as a control. The freezing process was carried out in 0.25 ml straws using liquid nitrogen, and then the thawing process was carried out in 30 seconds in a 37 °C water bath. Motility, dead-live spermatozoon rate, acrosome and membrane integrity (HOST: Hyperosmotic swelling test) of sperm samples after thawing were performed in HTF (Human Tubal Fluid) for 4 hours.

In the evaluation between groups after freezing - thawing, the highest motility values were found in the 0.5 M DMSO group with $40.0 \pm 2.88\%$. In terms of motility, there was no statistically significant difference between the Control, 0.25 M and 0.5 M DMSO groups ($p > 0.05$), while significant differences were found between these groups and the 1 M and 1.5 M DMSO groups ($p < 0.05$). The lowest rate of dead sperm after freezing-thawing was found in the 0.5 M DMSO group with $38.4 \pm 2.42\%$. In terms of viable spermatozoa ratio, 0.25 M and 0.5 M DMSO groups were found to be better than the control group ($p < 0.05$). The highest membrane integrity value between the groups after thawing was found in the 0.5 M DMSO group with $62.8 \pm 2.17\%$. It was determined that the membrane integrity of the 0.5 M DMSO group was better than the Control group ($p < 0.05$). In the evaluation between groups, the lowest rate of acrosome damage after freezing-thawing was found in the 0.25 M DMSO group with $8.6 \pm 0.85\%$. There was no statistical difference between the control and experimental groups in terms of acrosome damage, except for the 1.5 M DMSO group ($p < 0.05$). In the study, the 0.5 M DMSO group had the best result in motility rates up to the 3rd hour in the longevity test, which was performed at one hour time interval after freezing and thawing, and no motility value was detected in all groups at the 4th hour. As a result, it was determined that the addition of 0.5 M DMSO to the standard raffinose + skimmed milk powder extender on the freezability of mouse sperm improved the sperm quality parameters after thawing and could be used successfully.

Keywords: Mouse, spermatozoa, cryopreservation, DMSO.

1.GİRİŞ

Biyolojik bilimler alanındaki gelişmeler yirminci yüzyıl içerisinde hızla ilerlemiştir. Bu alanlar içerisinde biyoteknolojinin yeri ayrı bir öneme sahiptir. Özellikle reproduktif biyoteknoloji alanındaki gelişmelerle hayvansal üretimin iyileştirilmesi konusunda büyük yol alınmıştır. Dünyada bu alanda uygulanan ilk yöntem olan suni tohumlama uygulamasına ikinci başlayan ülke olmamıza karşın, bu yöntemin uygulamasında ortaya çıkan bazı nedenlerden dolayı, alınan yol arzu edilenin çok gerisinde kalmıştır (Sevinç 1983).

Üreme biyoteknolojisi hayvancılık alanında çok büyük öneme sahiptir. Bunun başlıca nedenleri; uygulama alanı olan suni tohumlama, gamet hücrelerinin kriyoprezervasyonu, liyofilizasyonu, in vitro fertilizasyonu, in vitro maturasyonu, gen transferleri ve klonlama gibi birçok alanda uygulama olanağı sağlamasıdır. Bu alanda uygulanan en yaygın biyoteknolojik yöntem, damızlık değeri yüksek olan erkek hayvanlardan alınan gamet hücrelerinin dondurması sonrasında dişi hayvanların genital sistemine uygun zaman ve yöntemle aktarılmasını içeren suni tohumlama yöntemidir. Bu yöntem sayesinde hayvan popülasyonunda kısa süre içerisinde istenen yönde genetik ilerleme sağlanabilmekte, genital yolla bulaşabilen hastalıkların önüne geçilebilmekte ve sürü içerisinde bir örneklik sağlanabilmektedir (Özkoca 1984; Hafez 1993; İleri ve ark. 2000; Pegg 2000).

Yardımcı üreme tekniği olan suni tohumlama ve embriyo transferinin gelişmesinde, üreme hücre ve dokularının başarılı bir şekilde dondurulup saklanması ve istendiği zaman çözdürülüp kullanılabilmesi oldukça önemlidir (Tunalı 2014). Genetik materyalin bahsedildiği gibi istenildiği gibi istenilen zamanda kullanılabilmesi, üreme alanında yaşanan sorunların başında gelmiştir. Bu sorunun çözümü için yapılan çalışmalarda erkek ya da dişi gamet hücresi üzerinde durulmuş ve birçok memeli türünde fertilitenin devamlılığını sağlayabilmesi adına bir takım ilerlemeler sağlanmıştır. Bu biyoteknolojik gelişimin kilit noktası ise kriyoprezervasyon olmuştur. Ancak, güncel tekniklerin çoğunda dondurma işleminin spermatozoonun fonksiyonu ve fertilite için olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir. Spermatozoon sulandırma, sulandırıcı olarak kullanılan maddelerin arasında peroksidasyon gibi çok sayıda reaksiyon ortaya çıktığı ve spermatozoonların toksik etkiye maruz kaldığı belirtilmiştir (Watson 1995; Pegg 2000; Tuncer ve ark. 2005).

Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına, hücre içi kristal oluşumuna çözüm sırasında dekristalizasyona ve gelişen membran dekristalizasyonuna karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılmaktadır. Genel olarak kriyoprotektan maddeler koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu arttırarak ve iyon miktarını azaltarak gösterirler. Kriyoprotektanların diğer bir önemli özelliklerinden biri olarak da düşük moleküler ağırlıkta olmaları ve toksik etkilerinin sadece yüksek oranda katılmasıyla açığa çıktığı bildirilmiştir (Polge ve ark. 1949; Watson 1979; Critser ve Mobraten 2000).

Kriyoprezervasyon işleminin spermatozoonlar üzerindeki istenmeyen olumsuz etkileri, nesli tükenmekte olan vahşi hayvan türlerinde istenilen zamanda ve düzeyde sperma alınamaması ve henüz pubertaya ulaşmamış türlerde spermatogenezisin başlamamış olmasından dolayı genetik materyalin korunması için farklı tekniklerin geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Bu durumda alınan dokunun kriyoprezervasyonu, farklı hayvan türlerinde genetik materyalin ve fertilitenin korunmasında önemli bir biyoteknoloji olarak yerini almıştır (Watson 1979; Critser ve Mobraten 2000; Oliveira 2015).

Bu çalışmayla, fare spermlerinin dondurularak saklanması, standart spermatozoon sulandırıcı olan kullanılan Raffinoz + Yağsız süt tozu karışımına ilave edilen düşük dozlardaki DMSO'nun sperm motilite, ölü-canlı, akrozom, plazma membran bütünlüğü ve motilite dayanıklılığı üzerine etkilerinin araştırılması ve böylece yeni fare sperm sulandırıcılarının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Önem

Farelerde çok sayıda suni mutasyonun oluşturulabildiği ve üreme aralığının çok kısa olmasından dolayı biyomedikal araştırmalarda ve genetik çalışmalarda en çok tercih edilen memeli türü olmuştur. Dünyada araştırma amacıyla yetiştirilen, inbred ve outbred olmak üzere 400 değişik fare soyu bulunmaktadır. Yapılacak olan araştırmalar doğrultusunda çeşitli özelliklere sahip özelleşmiş fare soyları üretilmiştir. Bu fareler başlıca; deneysel insan hastalık modellerinin oluşturulması, kanser, immünoloji, aşı ve ilaç yapımı gibi alanlarda kullanılmaktadırlar (Critser ve Mobraten 2000; Pegg 2000).

2.2.Spermatozoon Kriyoprezervasyonu

Kriyoprezervasyon hayvancılık alanında birçok kolaylık sağlayan önemli bir yöntemdir. Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama) işlemi, gelecekte kullanılması amacıyla, hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısılara kadar soğutularak, bütün biyolojik aktivitelerin dondurulmasını ifade eder. Bu işlemdeki temel amaç, çok düşük ısıda canlı hücre veya dokunun, en az hasarla ve herhangi bir fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır (Bailey ve ark. 2000; Pegg 2000). Erkek gamet hücresi olan spermatozoon'un dondurulmasındaki genel prensib, spermatozoonların kriyoprotektanlar ile dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen içerisinde -196°C'da depolanması, çözündürülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak spermilerin canlılıklarını ve ileri fizyolojik olaylar için fonksiyonlarını koruyabildikleri uygun ortamda tutulması ve dişi genital kanala aktarılmasıdır (Hammerstedt 1990; Gao ve Critser 2000; Pegg 2000; Gardner ve ark. 2009).

Spermatozoonları dondurmanın zararlı etkilerine karşı gliserolün koruyucu etkisi olduğu 1940'larda keşfedilmiş olup, bilimsel ve modern anlamda ilk kez spermatozoon dondurma işlemi gliserol kullanılarak 1949'da Chiristopher Polge ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Polge ve ark. 1949).

Spermatozoon başarıyla dondurulan ilk canlı hücrelerden olması bakımından önem taşımaktadır. Memeli spermatozoonlarının dondurulması ile kabul edilebilir fertilite sonuçların elde edilmesi bazı önemli faktörlerin etkisindedir. Bunlar arasında dondurma teknikleri, uygun sulandırıcı, spermatozoa sulandırma oranı, dondurma ve çözündürme hızı, türlere özgü spermatozoon fizyolojisi ve özellikleri sayılabilir (Pegg 2000; Purdy; 2006).

Kriyoprezervasyon aşamaları aşağıdaki sıralı olayları içermektedir:

- Suyun kristalizasyonundan kaynaklanabilecek hücresel hasarı azaltan kriyoprotektanlarla olan ilk etkileşimi
- Sıfır derecenin altındaki sıcaklıklara kadar dondurma
- Saklama
- Çözme
- Seyreltme ve kriyoprotektanların ortamdan uzaklaştırılması, fizyolojik mikro çevreye geri dönüş ve ileri gelişim olarak sınıflandırılabilir.

Bu aşamalar arasında en kritik olanı, başlangıç fazından düşük sıcaklıklara iniş dönemi ve fizyolojik ortama geri dönüştür. Düşük sıcaklıklara ulaştıktan sonra bu sıcaklık -196°C'dir. Bu sıcaklıkta geçen zamanın canlılık üzerine etkisi olmadığı bildirilmiştir (Gao ve Critser 2000; Pegg 2000; Delilbaşı 2008).

2.3. Sperma Sulandırıcıları

Kriyoprezervasyonun başarılı olması büyük ölçüde uygun sperma sulandırıcılarının geliştirilmesine bağlıdır. Sperma sulandırıcılarının kullanılmasının başlıca amaçları, spermanın hacmini arttırmak suretiyle daha fazla hayvan tohumlanması sağlamak ve spermanın saklanması sırasında spermatozoonların zarar görmesini engellemek suretiyle daha uzun bir süre yaşamalarını sağlamaktır.

İyi bir sperma sulandırıcısının şu özellikleri taşıyor olması gerekir;

- Spermanın sıcaklığı, vücut sıcaklığından 5°C ye kadar düşürülürken sulandırıcı spermatozoonları soğuk şokunun zararlı etkilerine karşı korumalıdır.
- Sulandırıcı, spermatozoon tarafından üretilen metabolizma artıklarını nötralize ederek pH değişikliklerini önlemeli yani tamponlama özelliğine sahip olmalı.

- Sperma sulandırıcısı, izotonik özellik taşımalı diğer bir ifadeyle sperma ile aynı osmotik basınca sahip olmamalı.
- Sulandırıcı spermatazoon metabolizması için besin maddeleri sağlamalıdır.
- Sulandırıcı, dondurma ve çözündürme sırasında oluşabilecek zararlara karşı spermatazoonların hücresel bütünlüğünü korumalıdır.
- Sulandırıcı, mikrobiyel kontaminasyonları kontrol altında tutmalıdır (Hammerstedt 1990; Hafez 1993; Gao ve Critser 2000; Pegg 2000).

2.4.Kriyoprotektanlar

Dondurma ve çözündürme işlemi sırasında ortaya çıkan ani sıcaklık değişikliklerine karşı spermatazoonları korumak amacıyla sperma sulandırıcılarına bazı kimyasal maddeler ilave edilmektedir. Bu maddelere ‘Kriyoprotektif Maddeler’ adı verilir. Spermatozoonun dondurulmasında kullanılacak sulandırıcıda kryoprotektif özellikli maddelerin bulunması gereklidir. Kriyoprotektanların koruyucu etkileri, suyla hidrojen bağları oluşturarak, buz kristallerinin boyutlarını küçültmeleriyle ortaya çıkmıştır. Gliserol ve propanediol, bu işi hidroksil grupları ile (-OH) yaparken dimetilsülfoksit (DMSO) ise oksijen atomu sayesinde yapmaktadır. Kriyoprotektanlar, medyumun donmadan kalan kısmındaki elektrolit konsantrasyonunu azaltarak koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Sanger ve ark. 1992; Pegg 2000; Porcu 2001). Bunlar kendi aralarında hücre içine girerek etki gösterenler ve hücre dışından etki gösterenler olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Bu alanda bilinen ve hücre içerisine girerek etki gösteren en önemli madde Gliserol’dür. Gliserolün soğuğa karşı korucu bir madde olarak, hücrelerin dondurulması esnasında faydalı etkilerinin farkına varılmasından sonra, bu madde spermanın, dondurulması amacıyla sulandırıcılara ilave edilerek başarılı bir şekilde kullanılmaya başlamıştır (Pegg 2000; Gardner ve ark. 2009; Elder ve Dale 2014).

Donma anında gerçekleşen en önemli olay hücrenin kristalleşmesidir. Bu olay neticesinde önemli pH değişiklikleri ve hücre dehidrasyonuna bağlı olarak hücre membranında yırtılmalar meydana gelir. Bu reaksiyon sırasında şekillenen kristaller ne kadar küçük hacimli olursa, meydana gelen hasar o kadar az olmaktadır. Sulandırıcılara katılan gliserol, spermatazoonlar içerisine girmek suretiyle hücre içerisindeki suyun kısmen dışarı çıkmasını sağlar.

Bu sayede bulunduğu ortamın donma noktasını düşürerek dondurma işlemi sırasında geniş buz kristallerinin şekillenmesine engel olur. Gliserol katılmadan yapılan dondurma işlemleri sonucunda spermatazoonların canlı kalma oranı önemli derecede azalmaktadır.

Bu amaçta buz kristallerini şekillenmesinin tamamen önlemesi için %30'dan daha fazla gliserol gereklidir. Ancak gliserolün hücre içine girişi esnasında hücre membranında oluşturduğu yapısal değişiklikler ve gliserolün suyun yerini almasından sonra hücre içi ve hücre dışında oluşan osmatik basınç farklılıkları nedeniyle belli oranda membran geçirgenliği bozulmakta ve hücrenin yapısal bütünlüğünde değişen derecelerde hasar oluşabilmektedir (Hammerstedt ve ark. 1990; Alvarenga 2000; Woods ve ark. 2000). Buna ilaveten, birçok hayvan türünde dondurulup çözündürülmüş spermada olduğu gibi dondurulmamış spermanın da kalitesini düşürdüğüne, akrozomal bozukluklara neden olduğuna ve akrozom reaksiyonunun başlamasını hızlandırması nedeniyle spermatazoonların fertilizasyon kapasitesini azalttığına dair çeşitli görüşler ileri sürülmektedir. Bu bozukluklar en belirgin olarak koç spermasında ortaya çıkmaktadır (Hafez 1993; Pegg 2000).

Bu zararlı etkilerin önlenmesi açısından gliserolün spermatazoon içeren sulandırıcılara kademeli bir şekilde katılması ve mümkün olduğunca ilave edilme oranının azaltılması tavsiye edilmektedir. Sulandırıcının içerisinde bulunan diğer maddelerin oranına bağlı olarak değişilmekle birlikte gliserol, yaygın olarak %3 ile %10 arasında değişen oranlarda sperma sulandırıcılarına ilave edilmektedir. Son zamanlarda, sulandırılmış spermaya ilave edilen gliserol oranının azaltılması ve alternatif maddeler geliştirilmesi üzerine yapılan bazı çalışmalarda, spermanın gliserol katılmadan sulandırıcı içerisindeki yumurta sarısı ve diğer bileşiklerin oranları ve osmotik basınç ayarlanarak başarılı bir şekilde dondurulabileceğini ve çözdürme sonrası yeterli motilitenin ve fertilizasyon kabiliyetinin elde edilebileceği bildirilmiştir (Hammerstedt 1990; Hafez 1993; Gao ve Critser 2000; Pegg 2000; Sönmez 2012).

Diğer önemli bir kriyoprotektan olarak Dimetülsüfoksit (DMSO) soğuk şokuna karşı spermanın korunması amacıyla sulandırıcılara ilave edilmektedir. Önemli tamponlama kabiliyetine sahip bir tuz olan DMSO, hızla hücre içerisine girerek membran bütünlüğünün korunması açısından önemli bir etkiye sahiptir. DMSO, kimyasal olarak bir polar kök etrafında iki apolar baştan oluşan amfipatik bir bileşiktir. Bu özellik ona hem sıvı hem de organik medyumlarda çözünme imkânı sağlamaktadır.

Hücre içine penetrasyonu düşük moleküler ağırlığından dolayı gliserole göre daha hızlıdır. Hücre dondurma medyumunda kombine kullanılan kriyoprotektanların toksisitesini azaltmak ve hücrelerin kriyoprotektanlara maruz kalma süresinin kısaltılması amacıyla kullanılmaktadır (Mcgann 1999; Massip 2001). Ayrıca Ethilen glikol ve Propilen glikol da spermaya kriyoprotaktif madde olarak sulandırıcılara belirli oranda ilave edilebilmektedir (Hafez 1993).

Bunun dışında yapılan bazı çalışmalarda, hücre içerisine giremeyen ve enerji maddesi olarak spermatozoonlar tarafından kullanılamayan raffinöz, sukroz, trehaloz ve laktoz gibi bazı şekerlerinde soğuğa karşı kriyoprotaktif etki gösterdiği ve bunlarında sperma sulandırıcılarına katılarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Evans ve Maxwell 1987; Palasız ve Mapletopt 1996; Jackson ve ark. 1997; Massip 2001). Sakkaritler, lethal etkili intrasellüler kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluşturduğu belirtilmiştir (Rudolph ve Crowe 1985; An ve ark.2000). Şekerler donma ve çözme sırasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak koruma sağladığı tespit edilmiştir. Hücre içine geçemeyen kriyoprotektanlar, membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranları esnek hale getirir. Bu olay çözünme esnasında hücresel şişmeyi engellemektedir. Ayrıca, hücrede donma-çözülme sırasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Hücre içine girebilen kriyoprotektanlara ilave edilen sıvılar düşük oranda kullanılmakta, bu da hücre içine geçebilen kriyoprotektanların olası toksik etkilerini osmotik basınç farklılıkları oluşturarak azalttığı belirtilmiştir (Mcgann 1999; Cabria ve ark. 2001; Bucak ve Tekin 2007).

2.5. Spermanın Saklanması

Sperma alındıktan sonra herhangi bir işleme tabi tutulmadan 35°C de 10-15 dakika içerisinde kullanılması gerekir. Bu şekilde sulandırılmadan spermanın 30 dakikadan fazla bekletilmesi dölleme gücünün hızla azalmasına yol açmaktadır. Ancak alınan spermanın kısa bir süre içerisinde kullanılabilme imkanının olmaması spermanın belli bir süre saklanması zorunlu hale getirmiştir. Spermanın uzun süreli saklanması, ancak uygun sulandırıcı içinde sıcaklığının düşürülmesiyle spermatozoonların hareketlerinin sınırlandırılmasını sağlamak suretiyle mümkündür (Hafez 1993; Pegg 2000; Sönmez 2012).

2.5.1. Spermanın Dondurulması

Spermanın uzun süre saklanabilmesi belli tekniklere göre dondurulmasıyla sağlanır. Bu tekniğin dayandığı temel ilke, spermanın çeşitli teknikler uygulanarak sıcaklığı'nın -79°C ya da -196°C ye kadar düşürülmesi ve bu sıcaklığı sağlayacak bir ortamda muhafaza edilmesidir. Bu sayede spermanın yıllarca saklanması mümkün olmaktadır (Hafez 1993; Pegg 2000).

2.5.2. Sıvı Azot Buharında Spermanın Dondurulması

Uygun bir kriyoprotektan ile tekniğine uygun olarak sulandırılan ve equilibasyonu işlemi tamamlanan sperma, plastik payetler içerisine doldurulduktan sonra alüminyum veya çelikten bir raf üzerine tek sıra halinde yerleştirilir. Raflar ağzı geniş bir sıvı azot tankında azot seviyesinin yaklaşık 6-7 cm üzerinde bulunan özel ızgaralar üzerine dizilerek tankın ağzı kapatılır. Bu bölgedeki sıvı azot buharı arzu edilen hızda spermayı dondurmaktadır. Payetler aşağı yukarı 2 dakika içinde sıvı azot buharının soğukluk derecesine ulaşır. Bu şekilde yaklaşık 7 dakika bekletilen payetler içirişindeki sulandırılmış spermanın dondurma işlemi tamamlanmaktadır (Hafez 1993; Pegg 2000; Sönmez 2012).

Dondurma işlemi tamamlana sperma payetleri, hızlı bir şekilde plastik gobletlere konularak -196°C sıcaklıktaki sıvı azot ihtiva eden azot muhafaza tanklarına aktarılır. Bu tanklar içinde payetler her hangi bir bozulmaya uğramadan uzun yıllar boyunca saklanabilir. Spermanın uzun süreli saklanması amacıyla rafinoz şekeri ve yağsız süt tozu farelerde; sodyum sitrat - yumurta sarısı sulandırıcısı boğalarda; tris – yumurta sarısı sulandırıcısı koç, teke, domuz, köpek ve kedilerde ve yağsız süt tozu - tris sulandırıcısı ise aygırlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sulandırıcıların içeriği türler arasında bazı küçük farklılıklar gösterebilmektedir (Hafez 1993; Pegg 2000).

2.5.3. Dondurma Hızı

Spermatazoonların biyokimyasal yapısı oldukça karışık ve sabit olmayan bir özellik taşır. Spermatazoon plazma membranının düzenli bir fonksiyon göstermesi açısından membran yapısındaki lipid ve protein bileşikleri arasında sıkı bir ilişki vardır. Spermatazoonların dondurulması, membran lipid katmanının iki tabakası arasındaki fosfolipid dağılımında değişikliğe yol açar.

Membranda meydana gelen bu değişiklikler, akrozom reaksiyonunu hızlandırarak akrozomal enzimlerin dışarı sızmasına veya aktivitelerin azalmasına neden olarak spermatazoonların motilitesini ve fertilizasyon kabiliyetini sınırlayabilir (Hafez 1993; Pegg 2000; Watson 1979; Critser ve Mobraten 2000).

Spermanın dondurulup çözündürülmesi esnasında spermatazoon membranındaki hasar özellikle buz kristallerinin şekillenme devresi olarak kabul edilen 0°C ile -20°C arasındaki sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Bu aralığın çok hızlı geçilmesi buz kristallerinin şekillenme hızını arttırmaktadır. Bu aralık geçilirken uygulanacak dondurma hızını 10°C/dakika olması tavsiye edilmektedir. Daha sonraki sıcaklık dereceleri olan -20°C ile -100°C arası ise 20°C/dakika olacak şekilde ayarlanabilir (Hafez 1993; İleri ve ark. 2000; Pegg 2000).

Spermatazoonların dondurma işlemi sırasında ani sıcaklık değişimlerine olan tolerans düzeyi türler arasındaki önemli derecede farklılık gösterebilmekte olup bu düzey spermanın başarılı bir şekilde dondurulmasını etkileyen en önemli faktörü oluşturur. Örneğin boğa ve aygır spermatazoonlarının bu koşullardaki dayanma yeteneği nispeten iyi iken aynı koşullarda fare ve koç spermatazoonlarının fertilizasyon kapasitesinin büyük oranda azaldığı bildirilmektedir (Hafez 1993; Pegg 2000).

Dondurma işlemleri esnasında uygulanan dondurma hızı, spermanın çözündürülmesi sonucundaki motilite ve akrozom bütünlüğünü etkilemektedir. Spermatazoonların canlı kalma oranı, mitekondrial aktivite ve akrozom bütünlüğü açısından spermanın hızlı bir şekilde (20°C/dakika) dondurulmasının yavaş bir şekilde (2°C/dakika) dondurulmasına göre daha büyük bir avantaj sağlamaktadır. Örneğin spermanın hızlı bir şekilde dondurulmasının yavaş bir şekilde dondurulmasına göre çözündürülme sonrası elde edilen motilite ve akrozom bütünlüğü yönünden önemli bir derecede daha iyi sonuçlar vermektedir.

Bununla birlikte spermanın bireysel ve tür özellikleri, kullanılan payet tipi, ilave edilen gliserol oranı ve sulandırıcının kimyasal yapısı dondurup çözme sonrası elde edilen başarıyı etkilemektedir (Hafez 1993; Watson 1979; Critser ve Mobraten 2000; Sönmez 2012).

2.6. Kriyoprezervasyon Hasarları

Kriyoprezervasyon sırasında hücrelerin strese maruz kalma durumuna kriyoprezervasyon hataları denir. Kriyoprezervasyon hasarlarının sebepleri:

- Hücre içi buz kristallerinin oluşumu
- Yoğun dehidratasyon
- pH değişiklikleri
- Protein denatürasyonu

Ani sıcaklık düşüşüne bağlı hücre yapısı ve fonksiyon hasarı, membran geçirgenliği ve hücre iskeleti yapısındaki değişikliklerle ilişkilidir (Elder ve Dale 2010; Critser ve Mobraten 2000).

Kriyoprezervasyon sırasında en temel hücre hasarı donma ve özellikle de çözme aşamasındadır. Hücreler aniden donarsa, hücre dışındaki su transferi ani ve aşırı olacağından membranda ozmotik hasar meydana gelir. Hızlı yerine yavaş yavaş çözülürse, bu sefer hücre içi buz kristalleri birleşebilir ve birbirleriyle büyüebilir ve tekrar hücre zarına zarar verebilir. Yavaş dondurma ve hızlı çözme bu nedenle önemlidir (Alberts ve ark. 2008). Kriyoprezervasyonda hücre hasarının nedenleri, buz kristallerinin neden olduğu yapısal hasarlar ve oksidatif stresle ilişkili reaktif oksijen radikallerinin neden olduğu hasarlar olarak özetlenebilir. Bununla birlikte, spermelerde en yaygın kriyo-hasarlar membran hasarı, organel ve DNA bütünlüğü (DNA parçalanması) hasarı, spermatozoonun fertilizasyon kapasitesini azaltan boyun kırıkları, akrozomal ve plazma membranlarında şişme ve parçalanma görülebilir (Askari ve ark. 1994; Verheyen ve ark. 1997; Paoli ve ark. 2014; Yeste 2016).

Çizelge2. 1. Kriyoprezervasyon Dondurma-Çözme İşlemi Etkileri (Yeste 2016)

Kriyoprezervasyonda Dondurma-Çözme İşlemlerinin Etkileri	
	Plazma Membranı Üzerine etkisi Membran destabilizasyonu, sıvıdan jel faza geçiş, İyon kanallarından fonksiyon kaybı, seçici geçirgenlik kaybı
	Spermatozoon nükleusu üzerine etkisi Protamin ve bazı histonların çekirdeklerdeki yer ve dağılımındaki değişiklikler, Protaminlerin sistein köprülerinde hasarlar, DNA fragmentasyonu, Fertilizasyon ve erken embriyo gelişiminde rol oynayan önemli genlerde lezyonlar
	Perinükleer tekaya etkisi Hücre iskelet elemanlarında hasarlar (F-aktin gibi), spermatozoon çekirdeği dekondensasyonu
	Mitokondriyal fonksiyon ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine etkisi Mitokondriyal aktivitede düşme, ROS seviyesinde artma
	Spermatozoon Vakuollerine etkisi Spermatozoon nükleer vakuolizasyonunda artış
	Spermatozoon Proteinlerinin seviyeleri, yerleri, fonksiyonları ve tirozin fosforilizasyonuna etkisi Spermatozoon protein seviyelerinde artış ya da azalışlar, yerleşimlerinde değişimler, iyon kanalları fonksiyonuna etkileri, tirozin fosforilizasyonunda değişiklikler

Çizelge2.1. devam Kriyoprezervasyonda Dondurma-Çözme İşlemlerinin Etkileri (Yeste, 2016).

	mRNA ve mikroRNA'lar üzerine etkisi
	Fertilizasyon ve doğum başarısı ile ilgili mRNA'larda azalma, bazı mRNA seviyesinde değişim
	Parantal epigenetik düzenleme üzerine etkisi
	Şimdiye kadar elde edilen verilerine göre sperm kriyoprezervasyonu gen baskılama açısından güvenli
	Spermatozoon hareketliliği üzerine etkisi
	Spermatozoon hareketliliğinde azalma

Çizelge2. 2. Kriyoprotektan Ajanların Spermatozoon Üzerine Etkileri.

Fiziksel ya da Kimyasal faktörler (Fizyolojik aralıklar dışında)	DNA Üzerine etkisi
Kriyoprotektanlar	Etilen glikol: Kromatin hasarına neden olur. Artan hiper-kromatize, eliptike ve premelt eğimini gösteren nihai erime profilini bozar. Polipeptide bağlı DNA nın yüksek erimesini model kompleksleri ve kromatin içerisindeki daha yüksek düzenlenmiş yapıyı istikrarsızlaştırır ve azaltır. Erime sıcaklığına etki eder ve B'den C'ye kromatin dönüşümü yapar (Taşdemir ve ark. 2013; Nelson ve Johnson 1970) 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 (Taşdemir ve ark. 2013; Nelson ve Johnson 1970; Kashino ve ark. 2010) Propilen glikol DNA metilasyonunu artırır (Hu ve ark.2012). Gliserol DNA'nın konformasyonunu değiştirir, istikrarı bozucu bir etkiye sahiptir, T erimesini azaltır ve DNA'nın termal stabilitesini baskılar (Sorokin ve ark. 1997; Nakanishi ve ark.1974).
Hiperosmotik stres	Oksidatif stres kromatin gevşemesine, kromozomal sapmalara, DNA çift zincir kırıklarına ve sonuçta DNA fragmentasyonunda artışa neden olur(Johnston ve ark.2012; Kultz ve Chakravarty 2001). Proteinlerin yanlış katlanmasına neden olur (Oganesyan ve ark. 2007). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükler (McCarthy ve ark. 2010). Artan süperoksit anyonu protein tirozin fosforilasyonunu artırır (Burnaugh ve ark. 2010).
Sıcaklık	Soğuk denatürasyonuna (protein polar olmayan grupların su ile, çok spesifik ve kuvvetli sıcaklığa bağlı etkileşimi) neden olur (Privalov 1990; Marenduzzo ve ark. 2001). Mutasyonları indükler (Todorova ve ark. 2012).

Çizelge2.2.devam Kriyoprotektan ajanların Spermatozoon üzerine etkileri.

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 (Jeng ve ark. 2015; Baumber ve ark. 2003)
pH	Deaminasyon, depurinasyon, depirimidasyona neden olur (Lindahl ve Nyberg 1972; An ve ark. 2014). Deaminasyon, Bileşiğin, yapısındaki amino gruplarını kaybetmesi. Depurinasyon: Çift sarmal DNA molekülü bütünlüğü içindeki azotlu bazlardan birinin kaybolmasını içerir. Depirimidasyona: DNA molekülü bütünlüğü içindeki azotlu bazlardan birinin kaybolmasını içerir. Aşırı yüksek veya düşük pH DNA sarmalını dengesizleştirir ve erime noktasını değiştirir (Williams ve ark. 2001).

2.7.Fare Spermatozoonları Üzerine Yapılan Araştırmalar

Fare spermatozoonlarının birçok türe göre dondurulma yeteneği oldukça düşüktür. Bununla birlikte özellikle dondurulma yeteneği ve başarısı üzerine, kullanılan fare ırkı, seçilen kryopreservatif madde, karbonhidratlar, lipidler, aminoasitler ve antioksidanların oldukça önemli etkileri bulunmaktadır (Evans ve Maxwell 1987; Tada ve ark. 1990; Takeshima ve ark. 1991; Dewit ve ark. 2000; Yıldız ve ark. 2007; Takeo ve Nakagata 2010).

Çizelge2. 3 Fare Sperm Kriyoprezervasyonu Üzerine Yapılmış Önemli Çalışmalar

Araştırmacı	Yıl	Araştırmanın Amacı	Kullanılan Sulandırıcılar	Sonuç
Graham ve ark.	1978	Fare spermleri üzerinde kroyoprezervasyon denemesi	Rafinoz ve gliserol	Dondurulmuş spermlerden ilk fareler üretildi.
Yokoyama ve ark.	1988	Farklı oranlarda rafinoz ve gliserolun sperm kroyoprezervasyonu üzerindeki etkileri	%20 rafinoz + %5 gliserol	%37 fertilizasyon
Tada ve ark.	1990	Farklı oranlarda rafinoz ve gliserolun farklı fare ırkları sperm üzerindeki etkileri	%18 raffinoz + % 1,75 gliserol	Farklı fare ırklarına göre % 13-65 fertilizasyon
Penfold ve Moore	1993	Farklı kryoprotektanların etkisi	Tris, gliserol, yumurta sarısı ve sodyum dodesil sülfat	%59 oranında fertilizasyon
Sztejn ve ark.	2001	%3 yağsız süt içerisinde internal ve eksternal kryoprotektanların farklı kombinasyonlarının motilite üzerindeki etkisi	- İnternal kryoprotektanlardan gliserol, formamid, propandiol, DMSO, adonitol - eksternal kryoprotektanlardan laktoz, rafinoz, sukroz, trehaloz, D-manitol kullanılmış	En yüksek Rafinoz + Yağsız süt tozu karışımından sırasıyla %23 motilite ve %42 membran bütünlük oranı tespit etmişlerdir
Yildiz ve Ark.	2007	Kryoprezervasyonun sperm kalitesine, nükleer DNA bütünlüğü, invitro fertilizasyonu ve invitro embriyo gelişimi üzerindeki etkileri	Farklı doğal ve kimyasal kryoprotektanlar ve yağsız süttozu	Sperm dondurmanın çözümü sonrası başarısı ve DNA bütünlüğünün korunması farklı kryoprotektan cinsi ve kullanılan fare ırkına bağlı olarak değişken olduğunu rapor etmişlerdir.

Araştırmacı	Yıl	Araştırmanın Amacı	Kullanılan Sulandırıcılar	Sonuç
Takeo ve Nakagata	2010	Glutaminin kryoprezervasyon üzerindeki etkisi	%18 raffinöz , % 3 yağsız, 100 mM/L glutamin ve metil b-siklodekstrin	Dondurup çözödürölen spermelerin dölleme yeteneklerinde ciddi oranında artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir.
Yıldız ve Ark.	2010	Kryoprezervasyonun mutant ve mutant olmayan fare spermelerinin dondurulabilirliğine, DNA bütönlüğüne, invitro fertilizasyonu ve invitro embriyo gelişimi üzerindeki etkileri	Rafinöz ve yağsız süttozu	Rafinöz ve yağsız süttozu karışımının farklı mutasyona tabi tutulmuş fare spermelerinin başarılı kryoprezervasyonun da güvenle kullanılabileceğini bildirmişlerdir.
Bertoldo ve ark.	2014	5000 µM Metforminin kryoprezervasyon üzerindeki etkisi	%22.5 raffinöz, %3 yağsız süt	Metforminin antioksidan etkisiyle dondurup çözödürme sonrasında fertilizasyon ve embriyo gelişim oranında artış elde etmişlerdir.
Wen Li ve ark.	2016	Glutasyonun ve MBSD'nin kryoprezervasyon üzerindeki etkisi	%18 raffinöz , %3 yağsız süt, 477 µM monothioglycerol, 100 µl MBSD, 1 mM Glutasyon	Glutasyonun antioksidatif etkisi sayesinde dondurulup çözödürölme sonrası spermelerin motilitelerinin arttığı, satrifüj işlemlerine karşı daha iyi korunduğu ve IVF oranının yükselttiğini tespit etmişlerdir.
Raspa ve ark.	2017	Dondurulmuş spermelerin kuru buz içerisinde saklanması	%18 raffinöz , %3 yağsız süt	-196 °Cdeki azot tankından alınan dondurulmuş spermelerin -80 °C deki kuru buz içerisinde dölleme yeteneğinde önemli bir kayıp olmaksızın 7 gün boyunca depolanabileceğini bildirmişlerdir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereç

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurul'u tarafından onaylanan bu çalışma 10/08/2021-05/11/2021 tarihleri arasında Hatay Mustafa Kemal üniversitesi deneysel araştırmalar uygulama merkezi ile Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalına bağlı laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada 12-24 haftalık yaşta 40 adet CD-1 ırkı erkek fare kullanılmıştır.

3.2.Yöntem

Deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve $24\pm3^{\circ}\text{C}$) uygun olarak yürütülmüştür. Deneysel uygulamalar süresince farelere standart ticari fare yemi (pellet yem) ve musluk suyu ad libitum sağlanmıştır. Bu çalışmada fare sperminin dondurularak saklanması, standart fare sulandırıcısı olan %18 Rafinoz (Biobasic- RJ392) + %3 Yağsız süt tozu (Monn-Bio) karışımına (Nakagata 2000), hücre içine girerek etkisini gösteren bir kriyoprotektan olan DMSO (Dimetil sülfoksit)'in farklı oranlarının sperm motilite, canlılık, akrozom, plazma membran bütünlüğü ve motilite dayanıklılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan 12-24 haftalık yaşta 40 adet CD-1 ırkı erkek fareler 5 gruba ayrılmıştır. Her araştırma grubu için 8 adet erkek fare kullanılmıştır.

3.2.1.Sperma sulandırıcılarının hazırlanması

3.2.1.1.Human Tubul Fluid (HTF)

Çalışmada kullanılan Human Tubul Fluid (HTF)'un kompozisyonu Tablo 1 de gösterilmiştir. Tabloda gösterilen kimyasallar 100 ml distile suya göre hazırlanmıştır.

Çizelge3. 1. Human tubul fluid (HTF)

HTF (Human Tubul Fluid)		
Kimyasallar	Miktar (100 ml için)	Tedarikçi Firma
NaCl	0.5938gr	Sigma S-5886
KCL	0.035gr	Sigma P-5405
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.03gr	Sigma C-7902
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.00493gr	Sigma M-7774
KH ₂ PO ₄	0.00503gr	Sigma P-5655
NaHCO ₃	0.2101gr	Sigma S-5761
Glucose	0.05gr	Sigma G-6152
Sodium lactate	342 µl	Sigma L-7900
Sodium pyruvate	0.00363gr	Sigma P-4562
Penicillin-G	0.0075gr	Sigma P-7794
Streptomycin	0.005gr	Sigma S-9137
Phenol red (0.5%)	40µl	Sigma P-0290

3.2.1.2.Kriyoprotektan ajan (CPA) ve Dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmesi.

Nakagata (2000)'nın formülüne göre, %18 Rafinoz + %3 yağsız Süt tozu karışımı 100ml distile su içinde çözdürülerek 14000g. daki soğutmalı bir santrifüjde çevrilmiş ve elde edilen süpernatanta farklı oranlarda DMSO eklenerek ana çalışma solüsyonları elde edilmiştir. Finalde araştırma gurupları aşağıdaki gibi özetlenmiştir;

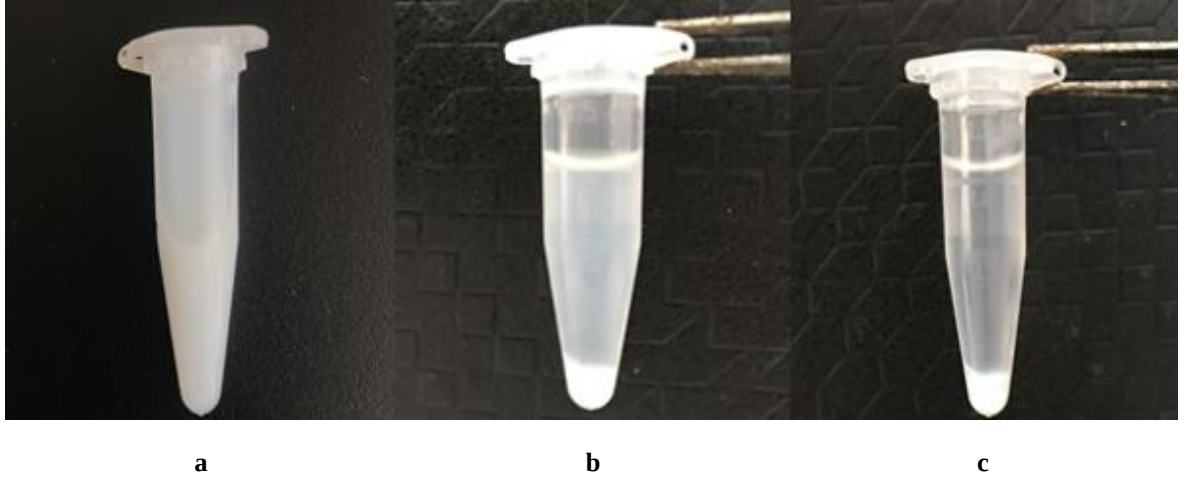
%18 Rafinoz + %3 yağsız Süt tozu (Kontrol)

%18 Rafinoz + %3 yağsız Süt tozu + 0.25 M DMSO

%18 Rafinoz + %3 yağsız Süt tozu + 0.50 M DMSO

%18 Rafinoz + %3 yağsız Süt tozu + 1 M DMSO

%18 Rafinoz + %3 yağsız Süt tozu + 1.5 M DMSO



Şekil 3. 1. Standart sperma sulandırıcısı (%18 Rafinoz + %3 yağsız Süt tozu)'nın işlem öncesi ve sonrasındaki görünümü a (santrifüjden önce), b (yetersiz santrifüj), c (yeterli santrifüj).

3.2.1.3. Plazma Membran Bütünlüğü (HOST) Solüsyonu

Hipo ozmotik şişme testi (HOST) Jeyendran ve ark.(1984)'nın bildirdiği formül modifiye edilerek yapıldı. Buna göre 100 ml distile su için; 0.55 gram Sodyum sitrat (Sigma-Aldrich-71405) ve 1,1 gram D-fruktuz (Carlo-Erba 452666) çözündürülerek HOST solüsyonu hazırlanmıştır. 45 dakika inkubasyondan sonra, kuyrukğunda kıvrılma, baş kısmında şişme olan spermiler HOS pozitif yani canlı olarak değerlendirilmiştir. Kıvrılmamış olanlar negatif olarak kabul edilmiştir.

3.2.2. Spermanın Alınması ve Sulandırılması

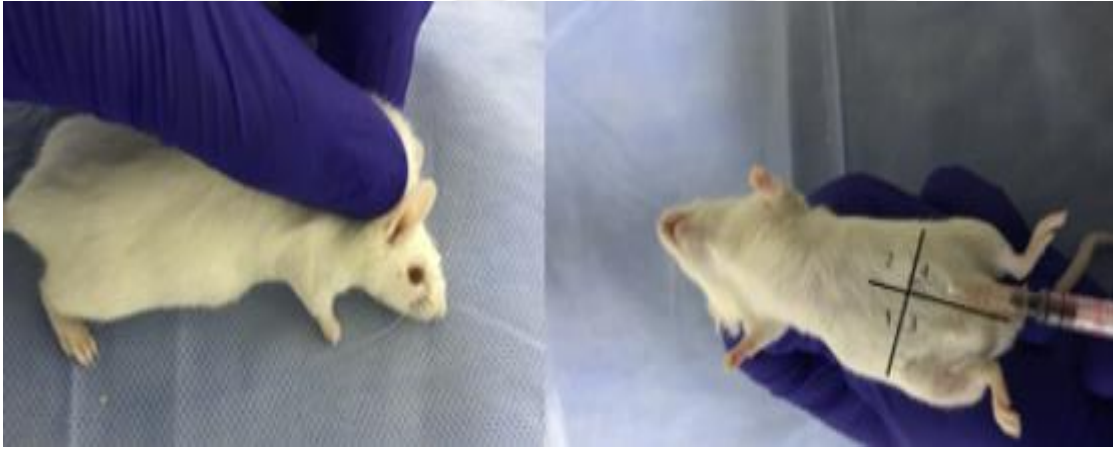
Kauda epididimisten spermatozoonların alınması; Çalışmada kullanılan erkek fareler ketamin/ksilazin anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi ve Laminer Flow kabini içerisinde steril şartlarda cerrahi yöntemlerle ürogenital bölgeye ulaşıldı. Sonrasında testisler dışarı alınıp yağ dokularından arındırılan cauda epididimisler diseke edildiler.

Sol ve sağ kauda epididimisler her biri aynı petri (isolab 60x15mm) kutusu içerisinde, önceden 37°C'ye inkubatorde ısıtılmış %18 Raffinoz ve %3 yağsız süt tozu sulandırıcısı içerisinde ve stereo mikroskop (Euromex/ Nexius Zoom) altında bistüri ve makas yardımıyla parçalanmış ve spermin sulandırıcıya çıkması sağlanmıştır.

Sperma örnekleri payetlere yüklenmeden önce (inkübasyon bittikten sonra) 10µl alınarak HTF solüsyonu ilave edilerek 1/10 oranında dilüe edilmiştir.

Motilite ve yoğunluk muayenesi için 10 dakika inkubasyon ve ekilibrasyona bırakılan sperma örnekleri önceden 37°C' ye ısıtılmış Makler lamı ile (Sefi medical, İsrail) faz kontrast mikroskop (olympus CX21, Japan) kullanılarak 20x büyütmede değerlendirilmiştir. Dondurma öncesi motilite ve yoğunluk muayeneleri yapılmıştır. Mililitrede 20-75 x10⁶ ve motilite değeri %70 ve üzeri olan sperma örnekleri dondurulmuştur.

Epididimal dokudaki spermatozoonların kontrol ve çalışma gruplarındaki sulandırıcılara ayrı ayrı sulandırılmış ve ardından 10 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Epididimal spermatozoonların numuneleri araştırma gruplarına göre ayrılarak final konsantrasyonu 1-3 x 10⁷ /ml spermatozoa olacak şekilde ayarlanmıştır. İnkübasyon sonrasında sulandırılan spermatozoonlar 0.25 ml'lik payetlere yüklenmiş ve sıcak pres ile payet uçları kapatılmıştır.



Şekil 3. 2. a (CD-1 ırkı farelerin zapturaptı) ve b (IP (Intraperitoneal) olarak anestezi altına alınma bölgesi).

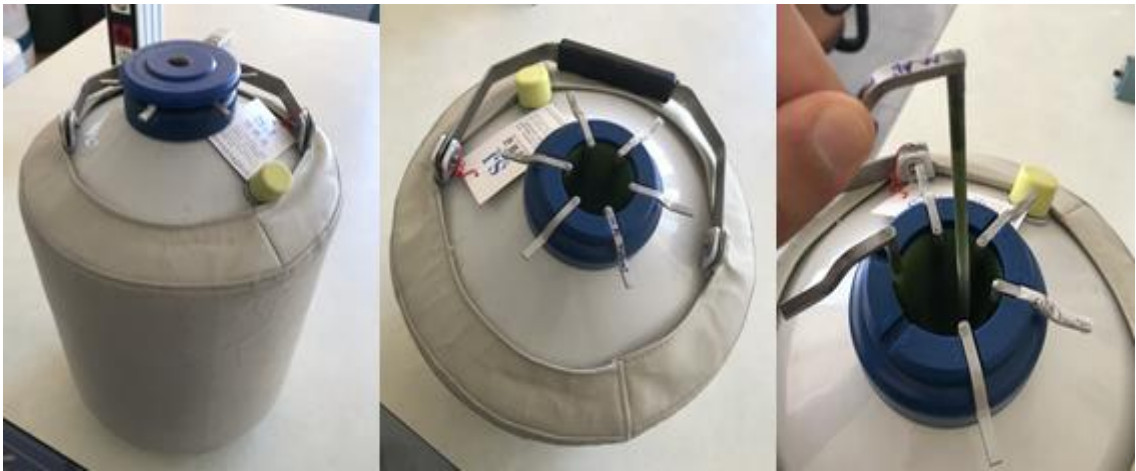


Şekil 3. 3. Stereo mikroskop(Euromex/ Nexius Zoom) ve stereo mikroskop kullanılarak epididimal dokudaki spermatozoonları doku dışına çıkarım işlemi.

3.2.3. Spermatozoonların donduma işlemi

Uçları pres ile kapatılmış olan payetler içerisinde sıvı azot olan strafor içerisindeki rafta 10 dakika süre ile sıvı azot buharında dondurmaya bırakılmıştır. Strafor içerisindeki sıvı azot yükseklik seviyesi 3.5 cm ve bu seviyenin 6 cm üzerinde raf seviyesi ayarlanmış şekildedir. 10 dakika sonrasında payetler raftan alınıp sıvı azot içerisine daldırılmıştır.

Sıvı azot içerisine bırakılan payetler çalışma grupları ayırt edilecek şekilde belirlenmiş olan goblet ve kanister içerisine aktarılarak azot tankına aktarılmıştır.



Şekil 3. 4.Dondurulmuş sperma örneklerinin saklandığı sıvı azot tankı.

3.2.4. Payetlerin çözdürülmesi

Her seferde bir payet olacak şekilde 37° C'de su banyosuna daldırılarak 30 saniye süreyle payetler çözdürülmüştür. Çözdürülen payetler 37°C karbondioksitli inkübatör içerisinde muhafaza edilen HTF medyumunu bulunan eppendorf (isolab) tübü içerisine aktarılmıştır (1/4 oranında). 10 dakika boyunca da inkübatörde bekletilen çözdürülmüş sperma örneklerinin spermatolojik analizleri yapılmıştır.

3.2.5. Taze ve donmuş-çözölmüş spermatozoon muayenesi

3.2.5.1. Spermatozoon motilitesi

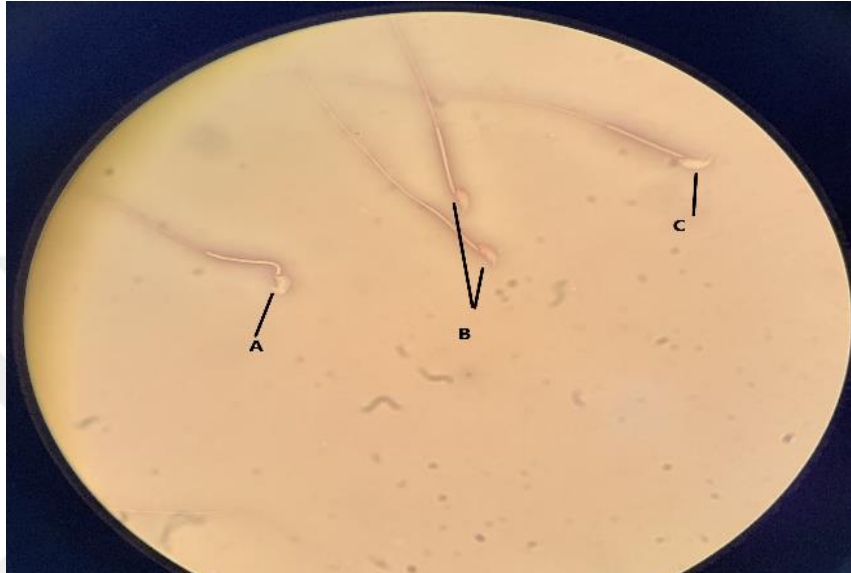
Motilite muayenesi Makler lamı (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) kullanılarak World Health Organization'a (WHO 1999) göre yapılmıştır. Mikroskobun ısıtma tablasında 37 °C' ye ısıtılmış olan Makler lamı ile faz kontrast mikroskop altında 20x büyütme altında değerlendirme yapılmıştır. Makler lamında yukarıdan aşağıya veya soldan sağa doğru 10'arlı kareler halinde, toplamda 100 adet muayene karesi bulunmaktadır.

İnkübasyon sonrası hazırlanan HTF ile sulandırılmış spermatozoon örneklerinden 10µl makler lamı üzerine alınarak, faz kontrast mikroskop (olympus CX21, Japan) altında ve 20x büyütmede, alanda yukarıdan aşağıya ya da soldan sağa başlanacak şekilde 10 adet kare belirlenerek (toplamda 100 adet kare) sayım yapılmıştır. Alandaki ileri yönde güçlü, düzgün ve doğrusal hareket yapan motil spermatozoonlar ile hareketsiz olan spermatozoonlar sayılmıştır. Bu işlem 3-4 kez tekrarlanarak motilite % olarak hesaplanmıştır.

3.2.5.2. Ölü-Canlı spermatozoon değerlendirmesi

Eozin-Nigrosin boyama yöntemi Watson (1975)'e göre yapılmıştır. Bu yöntemde lam üzerine bir damla sperma ile bir damla Eosin boyası ve karışımın üzerine de bir damla Nigrosin boyası eklenerek lamel ile sürme froti hazırlanmıştır.

Hazırlanan froti 60 °C deki ortamda hızlı bir şekilde kurutulmuştur. Faz kontrast mikroskopun (olympus CX21, Japan) 40x büyütme altında 300 hücre sayılmıştır ve spermatozoonun baş kısmı boya almayanlar canlı baş kısmı kırmızı şekilde boya almış olanlar ölü olarak kaydedilmiş ve sonuç % canlı oranı olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 5. Eozin-Nigrosin boyama yöntemi sonucu baş bütünlüğü bozulmuş (A), Ölü sperma(B), canlı sperma(C)

3.2.5.3. Plazma membran bütünlüğünün değerlendirilmesi (Hipo Osmotik Şişme Testi)

Spermatozoonların membransal yapılarının fonksiyonel sağlamlığını değerlendirmek için HOS test yapılmıştır. Jeyendran ve ark. (1984)'nın yaptığı çalışmaya göre hazırlanmış olan HOS solüsyonu, 37 °C deki inkübatör içerisinde muhafaza edilen eppendorf tüpü içine 100µl eklenmiş, üzerine 1/10 oranında inkübasyon halindeki sulandırılmış olan sperm örneğinden eklenmiş ve ardından 45 dakika inkübasyona alınmıştır.

İnkübasyon süresi bitiminde lam üzerine alınan 10µl bir örnek üzerine lamel kapatılmış ve faz kontras mikroskopunda 40x lik büyütmede 200 adet sperm hücresi sayılarak pozitif olanların (kuyruğu) oranı hesaplanmış ve sonuç % oranı olarak belirlenmiştir (Dewit ve ark. 2000).

Böylece düşük osmotik basınca dayanıklı ve canlı olan spermatozoonların oranı belirlenerek kullanılan spermilerin canlılığı ve dayanıklılığı hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

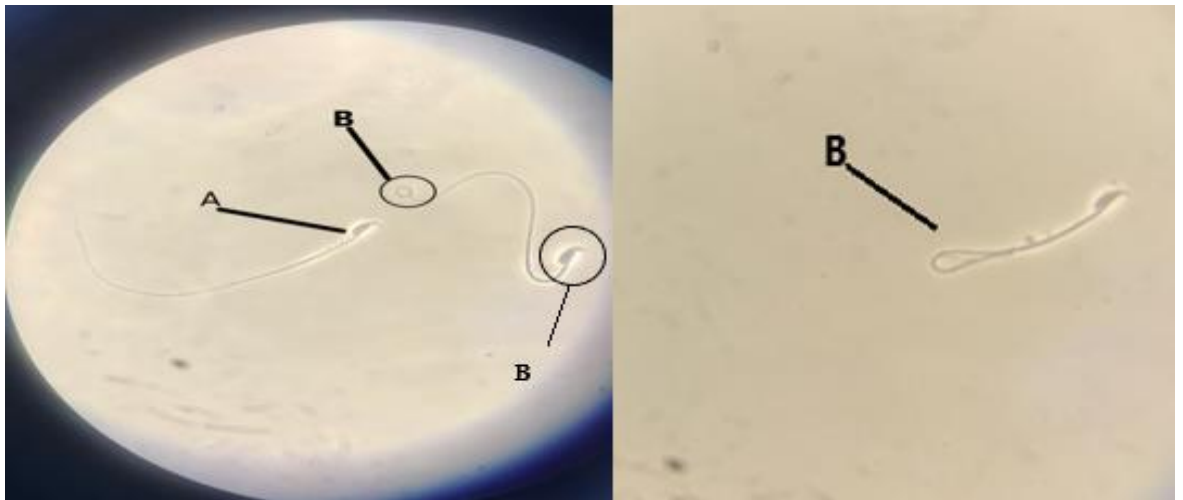
3.2.5.4. Akrozom Hasarı

Akrozom hasarının değerlendirilmesi Somfai ve ark. (2002)'a göre yapılmıştır. Tablodaki formülasyona göre hazırlanan Hancock solüsyonu Eppendorf tüpe 1 ml alınıp 1-2 damla sperma damlatılarak spermatozoonların tespit edilmesi sağlanmıştır.

Sonra bu karışımdan lam üzerine 50 µl alınarak üzerine lamel kapatılarak 100x objektifte immersiyon yağı ile incelenmiştir. Toplam 300 adet spermatozoonda Akrozom hasarına sahip olanlar % olarak belirlenmiştir.

Çizelge3. 2. Hancock solüsyonu.

1. Solüsyon	NaCl	1.13 gr
	Bidistile su add.	62.50 ml
2. Solüsyon	Na ₂ HPO ₄	2.71 gr
	Bidistile su add.	62.50 ml
	K ₂ HPO ₄	2.78 gr
	Bidistile su add.	62.50 ml
3. Solüsyon	1. Solüsyon	18.75L
	2. Solüsyon	12.50 ml
	Formalin	7.80 ml
	Bidistile su add.	62.50 ml



Şekil 3. 6. Hipoozmotik şişme test solüsyonuna spermaların verdiği reaksiyonların mikroskop altındaki görünümü. A) HOS- herhangi bir değişiklik yok, B) HOS+ kuyruğunda kıvrılma ve baş kısmında şişme var.

3.2.6. Motilite Dayanıklılık Testi (Longevity)

Payetlerin çözdürülmesi sonrası HTF ile sulandırılmış spermatozoon örnekleri sıfırncı saatte motilite muayeneleri yapıldı. Daha sonra HTF ile sulandırılmış olan spermatozoon örnekleri birer saatlik ara ile 10µl makler lamı üzerine alınarak faz kontrast mikroskop (olympus CX21, Japan) altında 20x büyütmede ve alanda yukarıdan aşağıya ya da soldan sağa başlanacak şekilde 10 adet kare (toplamda 100 adet kare) sayıldı. Alandaki ileri yönde güçlü, düzgün ve doğrusal hareket yapan motil spermatozoonlar ile hareketsiz olan spermatozoonlar sayıldı. Bu işlem 3-4 kez tekrarlanarak motilite % olarak hesaplanmıştır. Böylelikle çözdürülen payetlerdeki spermatozoonların çözdürüldükten sonra dayanıklılık süreleri tespit edilmiştir.

3.2.7.İstatistik

Araştırma sonucunda elde edilen verilerin standart hata ve ortalama değerleri hesaplanmıştır. İstatistiki değerlendirmelerde SPSS 22.0 paket programı kullanılmıştır. Sperma numunelerinden elde edilen verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulaması ve analiz sonucunda gruplar arası farkın önemini belirtmek için Duncan testi kullanılmıştır.

4.BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarında Dondurma Çözdürme Sonrası Spermatolojik Bulgular

Çizelge 4. 1. Çalışma gruplarında dondurma çözdürme sonrası spermatolojik bulgular.

Gruplar	Motilite (%)	Ölü spermatozoon Oranı (%)	Akrozom Hasarı (%)	Membran Bütünlüğü (HOS+) (%)
Kontrol	33.3±2.76 ^a	56.1±4.97 ^b	9.4±1.09 ^c	45.8±7.14 ^b
0.25 M DMSO	34.4±3.37 ^a	40.0±3.00 ^c	8.6±0.85 ^c	50.3±5.71 ^{ab}
0.5 M DMSO	40.0±2.88 ^a	38.4±2.42 ^c	9.7±0.40 ^{bc}	62.8±2.17 ^a
1 M DMSO	16.6±1.66 ^b	73.6±2.24 ^a	12.3±0.17 ^b	27.6±2.52 ^c
1.5 M DMSO	7.2±0.87 ^c	74.4±1.81 ^a	18.6±1.43 ^a	17.0±1.53 ^c

a-b-c: Her bir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan önemlidir (P<0.05).

4.1.1. Motilite Değerleri

Çözdürme sonrası spermatozoon numunelerinde saptanan motilite oranlarının gruplar arası değerleri çizelge 4.1.'de verilmiştir. Gruplar arası değerlendirmede en yüksek motilite değerleri %40.0±2.88, %34.4±3.37, %33.3±2.76 ile sırasıyla 0.5 M, 0.25 M DMSO ve Kontrol gruplarında bulunmuştur.

Dondurup çözdürme sonrası Kontrol, 0.25 M ve 0.5 M DMSO grupları arasında önemli istatistiki bir fark bulunmazken, bu gruplar ile 1 M ve 1.5 M DMSO grupları arasında motilite açısından önemli farklar bulunmuştur (p<0.05). Diğer bir ifadeyle deneme grupları kendi aralarında kıyaslandığında en düşük motilite değeri 1.5 M DMSO grubunda, en yüksek motilite değeri ise 0.5 M DMSO grubunda saptanmıştır (p<0.05).

4.1.2. Ölü Spermatozoon Oranı

Kontrol ve çalışma gruplarından elde edilen ölü spermatozoon oranlarının gruplar arası değerlendirmesini içeren çizelge 4.1.'de verilmiştir. Gruplar arası değerlendirmede dondurup çözündürme sonrası en yüksek ölü spermatozoon değeri 74.4 ± 1.81 ile 1.5 M DMSO grubunda, en düşük ölü spermatozoon oranı ise 38.4 ± 2.42 ile 0.5 M DMSO grubunda tespit edilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonucu kontrol grubu ile deneme grupları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Dondurup çözündürme sonrası Kontrol grubu, 0.25 M ve 0.5 M DMSO gruplarından daha fazla ölü spermatozoon oranına sahipken ($p < 0.05$), 1 M ve 1.5 M DMSO gruplarından daha düşük ölü spermatozoon değerine sahip olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

Diğer bir ifadeyle, deneme grupları kendi aralarında kıyaslandığında en düşük ölü spermatozoon değeri 0.5 M ve 0.25 M DMSO gruplarında, en yüksek ölü spermatozoon değerleri ise 1.5 M ve 1 M DMSO gruplarında saptanmıştır.

4.1.3. Akrozom Hasarı

Çalışmalardan elde edilen ve gruplar arası akrozom hasar oranlarını gösteren veriler çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Gruplar arası değerlendirmede dondurup çözündürme sonrası en yüksek akrozom hasarı 18.6 ± 1.43 değeri ile 1.5 M DMSO grubunda, en düşük akrozom hasarı oranı ise 8.6 ± 0.85 ile 0.25 M DMSO grubunda tespit edilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda kontrol grubu ile deneme grupları arasında, 1.5 M DMSO grubu hariç ($p < 0.05$), istatistiki önemli bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Deneme grupları kendi arasında kıyaslandığında 0.25 M DMSO grubu 0.5 M DMSO grubuna benzer, 1 M ve 1.5 M DMSO grubundan belirgin düşük değerlerde saptanmıştır. 0.5M DMSO grubu da 1 M DMSO grubu ile benzer saptanmıştır ($p < 0.05$).

4.1.4. Membran Bütünlüğü Değerleri (HOS+)

Çalışmada dondurma ve çözündürme sonrası gerçekleştirilen membran bütünlüğü değerlendirme testinde (HOST) belirlenen bulgular çizelge 4.1.'de gösterildiği gibidir. Gruplar arası en yüksek pozitif sağlam membran bütünlüğü değeri 62.8 ± 2.17 ile 0.5 M DMSO, grubunda saptanmıştır. En düşük membran bütünlüğü ise 17.0 ± 1.53 ile 1.5 M DMSO grubu da saptanmıştır. Yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda pozitif sağlam membran bütünlüğü Kontrol grubu, 0.25 M DMSO grubu ile benzer ($p > 0.05$), 0.5 M DMSO grubundan belirgin oranda düşük ($p < 0.05$), 1 M ve 1.5 M DMSO gruplarından belirgin oranda yüksek saptanmıştır ($p < 0.05$).

Deneme grupları kendi arasında membran bütünlükleri kıyaslandığında 0.25 M DMSO grubu 0.5 M DMSO grubuna benzer, ancak 1 M ve 1.5 M DMSO gruplarından da belirgin oranda yüksek değerde tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

4.1.5. Motilite Dayanıklılık (Longevite) Değerleri

Çalışmada dondurma ve çözündürme sonrası bir'er saatlik zaman aralığında gerçekleştirilen motilite dayanıklılık (longevite) testin'de gruplardan elde edilen değerler çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Dondurup çözündürme sonrası sıfıncı saatte spermatozoon numunelerinde saptanan en yüksek motilite değerleri 40.0 ± 2.88 ile 0.5 M DMSO ve 34.4 ± 3.37 ile 0.25 M DMSO ve 33.3 ± 2.76 ile Kontrol gruplarında olmuştur. Dondurup çözündürme sonrası Kontrol, 0.25 M ve 0.5 M DMSO grupları arasında önemli istatistiki bir fark bulunmazken, bu gruplar ile 1 M ve 1.5 M DMSO grupları arasında motilite açısından önemli farklar bulunmuştur ($p < 0.05$). En düşük motilite değeri 7.2 ± 0.87 ile 1.5M DMSO grubunda saptanmıştır ($p < 0.05$).

1.Saatın sonunda, spermatozoon numunelerinde saptanan motilite oranlarını gruplar arası değerlendirmesinde en yüksek motilite değerleri 24.4 ± 4.44 ile 0.5 M DMSO grubunda saptanmıştır.

Kontrol grubu 0.25 M DMSO grubu ile benzer saptanırken, 1 M ve 1.5 M DMSO grubundan belirgin oranda yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). 1.saatın sonunda 1 M ve 1.5 M DMSO gruplarında motilite sonlanmıştır ($p < 0.05$).

2.Saatın sonunda, spermatozoon numunelerinde saptanan motilite oranlarının gruplar arası değerlendirmesinde en yüksek motilite değerleri 11.1 ± 3.09 ile 0.5 M DMSO grubunda saptanmıştır. Kontrol grubu ile 0.5 M DMSO grubu hariç diğer deneme grupları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$).

3.Saatın sonunda, motilite oranlarının gruplar arası değerlendirmesinde en yüksek oran 4.4 ± 2.42 ile 0.5 M DMSO grubunda saptanmıştır ($p > 0.05$). 0.5 M DMSO grubu hariç diğer çalışma grupları arasında istatistiki bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

4.Saatte motilite sonlanmıştır ve gruplar arasında istatistiki bir önem saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Çizelge 4. 2. Zamana göre motilite dayanıklılık değerleri.

Motilite dayanıklılığı (%)					
Gruplar	0.Saat	1.Saat	2.Saat	3.Saat	4.Saat
Kontrol	33.3 ± 2.76^a	12.2 ± 4.68^b	5.5 ± 2.93^{ab}	2.2 ± 1.46^{ab}	0.0 ± 0.00
0.25 M DMSO	34.4 ± 3.37^a	12.2 ± 4.33^b	3.3 ± 1.66^b	0.0 ± 0.00^b	0.0 ± 0.00
0.5 M DMSO	40.0 ± 2.88^a	24.4 ± 4.44^a	11.1 ± 3.09^a	4.4 ± 2.42^a	0.0 ± 0.00
1 M DMSO	16.6 ± 1.66^b	0.0 ± 0.00^c	0.0 ± 0.00^b	0.0 ± 0.00^b	0.0 ± 0.00
1.5 M DMSO	7.2 ± 0.87^c	0.0 ± 0.00^c	0.0 ± 0.00^b	0.0 ± 0.00^b	0.0 ± 0.00

a-b-c: Her bir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan önemlidir ($P < 0.05$).

5. TARTIŞMA

Kriyoprotektanlar hücrenin soğutulması, dondurulması ve çözündürülmesi esnasında gelişen fiziksel, kimyasal ve oksidatif stresi ve bunlardan doğan ısı şoku, ozmotik değişim, intraselüler kristal oluşumu ve oluşan serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarları azaltmak amacıyla kullanılmaktadır (Ball ve ark. 2001; Aisen ve ark. 2005; Funahashia ve Sano 2005). Kriyopreservasyon amaçlı kullanılan kriyoprotektan maddeler koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu arttırarak ve iyon miktarını azaltarak gösterirler. Kriyoprotektanların diğer önemli özelliklerinden biri de düşük moleküler ağırlıkta olmaları ve toksik etkilerinin sadece yüksek oranlarda ilave edilmesiyle açığa çıkmasıdır (Polge ve ark. 1949; Watson 1979; Critser ve Mobraten 2000). Kriyoprotektan maddeler hücre içine girerek ve hücre dışında kalarak etkilerini gösterirler. Gliserol, DMSO (Dimetilsülfoksit) ve ProH (Propilen glikol) hücre içine girebilen koruyucu maddelerdir. Bunlar intrasellüler buz kristalleri oluşumunu -40°C 'a kadar düşürürler. Hücre dışında kalanlar ise disakkaritler (sükroz vb.) ve trisakkaritler (rafinoz vb.) dir. Bunlar donma sırasında hücre zarını ozmotik basınç değişikliğine karşı korurlar ve hücrenin çözdürme işlemi sırasında aşırı şişmesini önlerler (Watson 1979; Critser ve Mobraten 2000; Delilbaşı 2008). Bu çalışmada, CD-1 fare spermlerinin dondurularak saklanması standart sperm sulandırıcı olan rafinoz + yağsız süt tozuna ilave olarak hücre içine girerek koruyucu etki gösteren DMSO'nun düşük dozlarının sperm motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü ve motilite dayanıklılığı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada dondurup çözdürme sonrası hareket ve canlılık kriterleri olarak kabul edilen en yüksek motilite, canlı sperm ve sağlam plazma membran bütünlük oranları sırasıyla 40.0 ± 2.88 , 38.4 ± 2.42 ve 62.8 ± 2.17 oranları ile 0.5M DMSO ilave edilen araştırma grubunda bulunmuştur (çizelge 4.1).

Bu sonuç motilite açısından Kontrol gurubuna benzer ($p>0.05$), ancak canlı sperm ve sağlam plazma membran bütünlük oranları açısından Kontrol, 1.0 M DMSO ve 1.5 M DMSO guruplarının tamamından daha iyi bulunmuştur ($p<0.05$).

Dondurup çözündürme sonrası farklı saatlerdeki motilite dayanıklılık testinde yine 0.5M DMSO ilave edilen araştırma gurubunda bulunmuştur (çizelge 4.2).

Böylece çizelge 4.1 ve 4.2, hareket ve canlılık kriterleri açısından birlikte değerlendirildiğinde standart rafinoz + yağsız süt tozu karışımına 0.5 M DMSO ilavesinin, çalışmada ana referans alınan Nakagata (2000)'nın rafinoz + yağsız süt tozu (Kontrol gurubu) karışımına göre çözüm sonrası canlılık ve motilite değerlerini daha iyi koruduğunu ve ilerlettiğini göstermiştir. Yapılan tez çalışmasında hücre içerisine giren (DMSO) ve girmeyen (rafinoz) cryoprotektanların kombine kullanımında belirlenen bu sinerjetik olumlu etkiler, benzer bir şekilde sulandırıcı içerisine %18 rafinoz + %1.75 gliserol (Tada ve ark. 1990), %10 rafinoz + %5 gliserol (Yokoyama ve ark. 1990), %1.75 gliserol + %18 rafinoz (Dewitt ve ark. 2000) ve %6 gliserol + trehaloz (Storey ve ark.1998) ilave eden araştırmacıların sonuçlarıyla benzer bulunmuştur. Ayrıca Yıldız ve ark. (2007)'ı 0.3M rafinoz ve yağsız süt tozu karışımına 0.1M früktoz ilavesinin CD-1, B6129SF1 ve C3B6F1 farelerinde standart rafinoz + yağsız süt tozu karışımına göre dondurup çözündürme sonrası daha iyi ve yüksek spermatolojik değerler tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Sztejn ve ark. (2001) C57BL/6J ve CB6F1 farelerinde rafinoz + yağsız süt tozu sulandırıcısı ile kriyotüplerde dondurma-çözündürme sonrası sırasıyla %15 ve %23 motilite, %37 ve %42 membran bütünlük oranı tespit etmişlerdir. Liu ve ark. (2017) C57BL/6 ve DBA/2 farelerinde rafinoz + yağsız süt tozu sulandırıcısı ile payetlerde dondurma-çözündürme sonrası sırasıyla %15 ve %17 motilite, %30 ve %48 membran bütünlük oranı belirlemişlerdir. Yıldız ve ark. (2010) CD-1 farelerinde rafinoz + yağsız süt tozu sulandırıcısı ile kriyotüplerde dondurma-çözündürme sonrası sırasıyla %23 motilite, %36.2 membran bütünlük oranı elde etmişlerdir. Sunulan araştırmada'da payetlerden çözüm sonrası tespit edilen 40.0 ± 2.88 motilite ve 62.8 ± 2.17 sağlam membran bütünlüğü oranları yukarıdaki birçok araştırmacıdan yüksek bulunmuştur. Bu sonuç farklılığının kullanılan fare ırkından, sulandırılmış spermanın paketlenme şekline ve dondurma prosedür farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Birçok araştırmacı kullanılan fare ırkının spermin dondurma başarısı üzerinde önemli bir faktör olduğunu rapor etmişlerdir (Tada ve ark. 1990; Takeshima ve ark. 1991; Yıldız ve ark.2007) .

Benzer şekilde, farklı türlerde şeker tiplerinin farklı kryoprotektanlar (gliserol ve DMSO gibi) ile birlikte farklı türlerde kullanımının da sperm değerlendirme kriterleri üzerine koruyucu ve geliştirici etkileri. Koç (Molinia ve ark. 1994), Sığır (Garcia ve Graham 1989), Köpek (Yıldız ve ark. 2000) ve İnsan (Critseral ve ark. 1988; Mc Gonagle ve ark. 2002) spermalarında'da daha önceden tespit edilmiştir.

Ayrıca, sperma sulandırıcısının başarısı, sulandırılan spermanın paketlenme şekillerine (payet, kriyotüp, pelet vb.), sulandırıcıda kullanılan koruyucu komponentlere, hücredeki geçirgenlik farklılıklarına, sperma dondurma metotlarına, sulandırıcının bileşenlerine ve ozmotik basıncına bağlı olduğu bildirilmiştir (Evans ve Maxwell 1987; Jackson ve ark. 1997).

Deneme grupları kendi aralarında kıyaslandığında en düşük motilite, membran bütünlük ve en yüksek ölü spermatozoon değerleri 1 M ve 1.5 M DMSO gruplarında belirlenmiştir. Bu anlamlı düşme, bu guruplara eklenen DMSO'nun fizyolojik sınırı aşarak, sperm hücreleri üzerinde toksik bir etki meydana getirmesinden kaynaklanmış olabilir. Önceden rapor edildiği gibi, eğer kryoprotektanlar uygun molar konsantrasyonda kullanılmaz ise, donma sırasında yetersiz veya aşırı su kaybına, hücre içi elektrolit konsantrasyonun bozulmasına, membranlarda hasar ve ölümle sonuçlanan hücre içi ve dışı buz kristallerine sebep olabileceği bildirilmiştir (Critser ve ark. 1988; Hammerstedt ve ark. 1990, Parks ve Graham 1992).

Yapılan tez çalışmasında, dondurup çözündürme sonrası en yüksek akrozom hasarı 18.6 ± 1.43 değeri ile 1.5 M DMSO grubunda, en düşük akrozom hasarı oranı ise 8.6 ± 0.85 ile 0.25 M DMSO grubunda tespit edilmiştir (çizelge 4.1). Liu ve ark. (2017) C57BL/6J ve DBA/2J ırkı farelerde rafinoz + yağsız süt tozu sulandırıcısından dondurma sonrası sırasıyla %15.6 ve %20.4 oranında akrozom hasarı tespit etmişlerdir. Bu sonuç sunulan çalışmada, CD-1 farelerinde test ettiğimiz 0.25 M DMSO, 0.5 M DMSO ve Kontrol gruplarında sırasıyla belirlenen 9.7 ± 0.40 , 8.6 ± 0.85 ve 9.4 ± 1.09 'luk oranlardan yüksek olduğu gözlenmiştir.

Soy içi (inbred) ırkların (C57BL/6, 129S ve DBA/2 gibi), soy dışı (outbred) (ICR ve CD-1 gibi) ve melezlere (hybrid) (CB6F1 gibi) göre donma hasarlarına karşı akrozom bölgesinin ve hücre membranının çok daha duyarlı ve dayanıksız olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (An ve ark. 2000; Yıldız ve ark. 2007; Nakagata 2011). Yapılan değerlendirme sonucunda 1.5 M DMSO grubu hariç ($p < 0.05$), kontrol grubu ile deneme grupları arasında ise akrozom açısından önemli bir istatistikî fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

Kryoprotektanların (DMSO, Gliserol ve Rafinoz vb.) uygun dozlarının sperm sulandırıcısına ilavesinin donma hasarlarına karşı başta akrozom gibi hücre membranlarını etkili olarak koruduğu birçok araştırmacı tarafından temel çalışmalarda rapor edilmiştir (Watson 1979; Critser ve Mobraten 2000; Ağca ve ark. 2002).

Sunulan çalışmada da DMSO ve Rafinoz'un uygun dozlarının tek veya birlikte kullanımının benzer şekilde akrozom üzerinde koruyucu etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Ayrıca, çalışmamıza benzer şekilde, dondurma medyumuna eklenen sukroz ve gliserol karışımının sinerjistik etki yaparak başarılı bir şekilde donma hasarlarına karşı embriyoyu ve boğa spermini koruduğu da önceden bildirilmiştir (Honadel ve Killian 1988; De Leeuw ve ark. 1992).

6. SONUÇ

Sunulan çalışma, fare sperminin başarılı olarak dondurulabilmesi için standart raffinoz + yağsız süt tozu sulandırıcısına eklenen düşük dozda dimetil sülfoksit (DMSO) oranlarının çözüm sonrası sperm kalite parametreleri üzerine etkilerini ortaya koymak için tasarlanmıştır. Çalışmada %18 rafinoz + %3 yağsız süt tozu içeren standart sperm sulandırıcısına 0.25M, 0.5M, 0.1M ve 1.5 Molar oranlarında ayrı ayrı gruplar olarak DMSO eklenmiştir. DMSO ilavesiz %18 Rafinoz + %3 yağsız süt tozu kombinasyonu kontrol olarak tutulmuştur. Dondurma işlemi sıvı azot kullanılarak 0.25ml'lik payetlerde yapılmış ve ardından çözündürme işlemi ise 37 °C'lik su banyosunda 30 saniyede gerçekleştirilmiştir. Çözüm sonrası sperm örenklerinin motilite, ölü-canlı, akrozom, membran bütünlüğü ve HTF (Human Tubal Fluid) içerisinde 4 saat süresince motilite dayanıklılık testleri yapılmıştır.

Dondurup çözündürme sonrası gruplar arası değerlendirmede en yüksek motilite değerleri 40.00 ± 2.88 ile 0.5 M DMSO grubunda bulunmuştur. Motilite açısından Kontrol, 0.25 M ve 0.5 M DMSO grupları arasında önemli istatistiki bir fark bulunmazken ($p > 0.05$), bu gruplar ile 1 M ve 1.5 M DMSO grupları arasında önemli farklar bulunmuştur ($p < 0.05$). Dondurup çözündürme sonrası en düşük ölü spermatozoon oranı ise 38.44 ± 2.42 ile 0.5 M DMSO grubunda tespit edilmiştir. Canlı spermatozoon oranı açısından 0.25 M ve 0.5 M DMSO grupları Kontrol grubuna göre daha iyi bulunmuştur ($p < 0.05$). Çözüm sonrası gruplar arası en yüksek sağlam membran bütünlüğü değeri 62.88 ± 2.17 ile 0.5 M DMSO grubunda saptanmıştır. Sağlam membran bütünlüğü 0.5 M DMSO grubunun Kontrol grubun'dan daha iyi olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Gruplar arası değerlendirmede dondurup çözündürme sonrası en düşük akrozom hasarı oranı ise 8.67 ± 0.85 ile 0.25 M DMSO grubunda tespit edilmiştir. Akrozom hasarı açısından kontrol grubu ile deneme grupları arasında, 1.5 M DMSO grubu hariç ($p < 0.05$), istatistiki bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Çalışmada dondurma ve çözündürme sonrası bir'er saatlik zaman aralığında gerçekleştirilen motilite dayanıklılık (longevity) testin 'de 3. saate'e kadar motilite oranlarında en iyi sonuç 0.5 M DMSO grubu olmuş ($p < 0.05$), ve 4. saatte tüm gruplarda motilite değeri saptanmamıştır.

Sonuç olarak, Fare sperminin dondurulabilirliği üzerine standart rafinoz - yağsız süt tozu sulandırıcısının 0.5 M DMSO ile kombine kullanımı çözüm sonrası sperm kalite parametrelerini geliştirdiği belirlenmiştir.



7. KAYNAKLAR

1. **Agca Y, Gilmore J, Byers M, Woods EJ, Liu J, Critser JK.** Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biology of Reproduction*, **2002**, s. 67 1493–1501.
2. **Aisen EG, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A.** Ultramicroscopic and Biochemical Changes in Ram Spermatozoa Cryopreserved With Trehalose-Based Hypertonic Extenders. *Cryobiology*, **2005**, s. 50: 239-249.
3. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts, K ve ark.** Hücrenin Moleküler Biyolojisi.(TÜBA yayınları, Çev.) Ankara: *Garland Science*, **2008**.
4. **Alvarenga MA, Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM.** Acrozomal Ultrastructure Of Stallion Spermatozoa Cryopreserved With Ethylene Glycol Using Two Packing Systems. *Equine Vet J*, **2000**, s. 32: 541-545.
5. **An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Sakurai T, Kashi M.** Factors Affecting The Survival Of Frozen Mouse Spermatozoa. *Cryobiology*, **2000**, s. 40: 237-249.
6. **An R, Jia Y, Wan B, Zhang Y, Dong P ve ark.** Non-enzymatic depurination of nucleic acids: factors and mechanisms. **2014**, s. 9(12):e115950.
7. **Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A.** Effect of natural antioxydants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freez thaw process. *Arch Androl.* **1994**, s. 33(1):11-15.
8. **Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N.** Semen Cryopreservation in Domestic Animals Adamaging And Capacitation Phenomenon. *J.Andrl*, **2000**, s. 21: 1-7.as
9. **Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J.** Effect of Antioxidants on Preservation of Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Equine Spermatozoa During Storage at 5°C. *Theriogenology*, **2001**, s. 56: 577-589.
10. **Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA.** Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl*, **2003**, s. 24(4):621-8.
11. **Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, Guillory, Froment P.** Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology*, **2014**, s. 68(2): 262-268
12. **Bucak MN ve Tekin N.** Kryoprotektanlar ve Gamet Hücrelerinin Dondurulmasında Kryoprotektif Etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2007**, s. 54: 67-72.
13. **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**, s. 117(3-4):249-60.
14. **Cabria E, Anel L, Herraes MP.** Effect of External Cryoprotectants As Membrane Stabilizers on Cryopreserved Rainbow Trout Sperm. *Theriogenology*, **2001**, s.52: 623-635.

15. **Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD.** Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertility and Sterility*, **1988**, s. 50 314–32
16. **Critser JK, Mobraten LE.** Cryopreservation of Murine Spermatozoa. *ILAR Journal*, **2000**, s. 41 4.
17. **De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ.** Effects of various cryoprotectand agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, **1992**, s. 30 32–44.
18. **Delilbaşı L.** *İn Vitro Fertilizasyon Laboratuar Yöntemleri*. “Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, **2008**, s. 229-255.
19. **Delilbaşı L.** *A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar*, Veri Medikal Yayıncılık, İstanbul, **2008**, s. 229-258.
20. **Dewit M, Marley WS, Graham JK.** Fertilizing Potential of Mouse Spermatozoa Cryopreserved in a Medium Containing Whole Eggs *Cryobiology*, **2000**, s.40, 36–45.
21. **Elder K, Dale B.** (2010). *İn-Vitro Fertilizasyon*. “1. Baskı”, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **2014**, s. 191-216.
22. **Evans G, Maxwell WMC.** *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths, pp, Sidney, **1987**, s. 8(21): 107-141.
23. **Funahashia H, Sano T.** Select Antioxidants Improve The Function of Extended Boar Semen Stored At 10°C. *Theriogenology*, **2005**, s. 63: 1605-1616.
24. **Gao D, Critser JK.** Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *Ilar journal*, **2000**, s. 41(4): 87-196.
25. **Garcia MA ve Graham EF.** Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effects of sugars alcohols on post thaw motility. *Theriogenology*, **1989**, s. 31 1029–1037.
26. **Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z.** *Textbook Of Assisted Reproductive Laboratory and Clinical Perspectives* Cryopreservation of Gametes and Embryos. 3th. Ed., CRC Basım, Londra, **2009**, s. 375-458.
27. **Graham EF, Schmehl MK, Evensen BK, Nelson DS.** *Semen preservation in non-domestic mammals*. In Symp Zool Soc Lond, **1978**, s. 43: 153-173
28. **Hafez ESE.** *Reproduction in farm animals*, “6th Ed”, Philadelphia, **1993**, s. 330-343, 405-423.
29. **Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP.** Cryopresarvation of Mammalian Sperm: What We Ask Them To Survive. *Journal of Andrology*, **1990**, s. 11: 73-88.
30. **Honadel TE ve Killian GJ.** Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol. *Cryobiology*, **1988**, s. 25 331–337.
31. **Hu W, Marchesi D, Qiao J, Feng HL.** Effect of slow freeze versus vitrification on the oocyte: an animal model. *Fertil Steril*, **2012**, s. 98(3):752-60.
32. **İleri IK, AK, Pabuççuoğlu S, Birler S.** *Reproduksiyon ve Suni Tohumlama*, Ders Notu, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul, **2000**, s. 79-90.
33. **Jackson TH, Ungan A, Crister JK, Gao D.** *Cryobiology*, Novel Microwave Technology for Cryopreservation of Biomaterials by Suppression of Apperant Ice Formation. **1997**, s. 34: 363-372.

34. **Jeng HA, Pan CH, Chao MR, Lin WY.** Sperm DNA oxidative damage and DNA adducts. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, **2015**, s.794:75-82.
35. **Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD.** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility*, **1984**, s. 70(1): 219-228.
36. **Liu J, Mochida, K, Hasegawa, A, Inoue K, Ogura A.** Identification of quantitative trait loci associated with the susceptibility of mouse spermatozoa to cryopreservation. *Journal of Reproduction and Development*, **2017**.
37. **Johnston SD, Satake N, Zee Y, López-Fernández C, Holt WV ve ark.** Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. *Reproduction*, **2012**, s.143(6):787-97.
38. **Kashino G, Liu Y, Suzuki M, Masunaga S, Kinashi Y ve ark.** An alternative mechanism for radioprotection by dimethyl sulfoxide; possible facilitation of DNA double-strand break repair. *J Radiat Res*, **2010**, s. 51(6):733-40.
39. **Kultz D, Chakravarty D.** Maintenance of Genomic Integrity in Mammalian Kidney Cells Exposed to Hyperosmotic Stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **2001**, s.130(3):421- 8.
40. **Li MW, Glass OC, Zarrabi J, Baker LN, Lloyd KK.** Cryorecovery of mouse sperm by different IVF methods using MBCD and GSH. *Journal of fertilization in vitro*, **2016**, s. 4(2).
41. **Lindahl T, Nyberg B.** Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **1972**, s. 11(19):3610-8.
42. **Massip A.** Cryopreservation of Embryos of Farm Animal. *Reprod Dom Anim*, **2001**, s. 36: 49-55.
43. **Mcgann LE.** Differing Action of Penetrating and Nonpenetrating Agents. *Cryobiology*, **1999**, s. 15: 382-390.
44. **McCarthy MJ, Baumber J, Kass PH, Meyers SA.** Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biol Reprod*, **2010**, s.82(3):644-51
45. **McGonagle LS, Goldstein M, Feldschuh J, Foote RH.** The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asian Journal of Andrology*, **2002**, s. 4 137–141.
46. **Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC.** In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reproduction, Nutrition, Development*, **1994**, s. 34 491–500.
47. **Marenduzzo D, Trovato A, Maritan A.** Phase diagram of force-induced DNA unzipping in exactly solvable models. *Phys Rev E*, **2001**, s. 64(3 Pt 1):031901.
48. **Nakagata N.** Cryopreservation of Mouse Spermatozoa and In Vitro Fertilization, *Methods Mol Biol*, **2011**, s. 693: 57–73.
49. **Nakagata, N.** Cryopreservation of Mouse Spermatozoa. *Mammalian Genome*, **2000**, s.11(7): 572-576.
50. **Nakanishi S, Adhya S, Gottesman M, Pastan I.** Activation of transcription at specific promoters by glycerol. *J Biol Chem*, **1974**, s. 249(13):4050- 6.

51. **Nelson RG, Johnson WC Jr.** Conformation of DNA in ethylene glycol. *Biochem Biophys Res Commun*, **1970**, s. 41(1):211-6.
52. **Oganesyan N, Ankoudinova I, Kim SH, Kim R.** Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein Expr Purif*, **2007**, s. 52(2):2.
53. **Oliveira ECS.** Cryopreservation of Testicular Tissue. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **2015**, s. 39(1):109-110.
54. **Özkoca A.** *Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama*. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, "4. Baskı" İstanbul, **1984**, s. 79-89.
55. **Palasz AT, Mapletopt RJ.** Cryopreservation of Mammalian Embryos and Oocytes: Recent Advances. *Biotechnol Adv*, **1996**, s. 14: 127-149.
56. **Paoli D, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Sperm Cryopreservation: Effects on Chromatin Structure. **2014**, s. 138-150.
57. **Parks JE ve Graham JK.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, **1992**, s. 38 209–222.
58. **Pegg DE.** The History and Principles of Cryopreservation. *Semin. Reprod. Med*, **2000**, s. 20(1): 5-13.
59. **Penfold LM, Moore HDM.** A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil*, **1993**, s. 99: 131-134.
60. **Privalov PL.** Cold denaturation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **1990**, s. 25(4):281-305
61. **Polge C, Smith AU, Parkes AS.** Revival of Spermatozoa After Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, **1949**, s. 164(4172): 666.
62. **Porcu E.** Oocyte Freezing. *Semin. Reprod. Med*, **2001**, s. 19(3): 221-230.
63. **Purdy PH.** A Review on Goat Sperm Cryopreservation. *Small Rum. Res*, **2006**, s. 63: 215- 225.
64. **Raspa M, Guan M, Paoletti R, Montoliu L, Ayadi A ve ark.** Infrafrontier Technical Working Group. Dry ice is a reliable substrate for the distribution of frozen mouse spermatozoa: A multi-centric study. *Theriogenology*, **2017**, s. 96: 49-57.
65. **Rudolph AS, Crowe JH.** Membrane Stabilization During: The Role of Two Natural Cryoprotectants, Trehalose and Proline. *Cryobiology*, **1985**, s. 22: 367-377.
66. **Sanger WG, Olson JH, Sherman JK.** Semen Cryobagofnking for Men With Cancer--Criteria Change. *Fertil Steril*. **1992**, s. 58(5):1024-1027.
67. **Sevinç A.** *Dölerme ve Suni Tohumlama*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları:397, 3.Baskı, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, **1983**, s.160-163.
68. **Somfai T, Bodo, SZ, Nagy SZ, Gócza E, Iváncsics J ve ark.** Simultaneous evaluation of viability and acrosome integrity of mouse spermatozoa using light microscopy. *Biotechnic & histochemistry*, **2002**, s. 77(3), 117-120.
69. **Sorokin VA, Gladchenko GO, Valeev VA, Sysa IV, Petrova LGve ark.** Effect of salt and organic solvents on DNA thermal stability and structure. *J Mol Struct*, **1997**, s. 408-409:237-40.

70. **Sönmez M.** *Reprduksiyon, Suni Tohumlama Ve Androloji Ders Notları*. Fırat Üniv. Vet Fak, Elazığ, **2013**, s.261-271.
71. **Storey BT, Noiles EE, Thampson KA.** Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, **1998**, s. 37 46–58.
72. **Sztejn JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE.** Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, **2001**, s. 42 28–39.
73. **Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S.** Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *Journal of Reproduction and Fertility*, **1990**, s. 89 511–516.
74. **Takeo T, Nakagata N.** Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Laboratory animals*, **2010**, s. 44(2): 132-137.
75. **Takeshima T, Nakagata N, Ogawa S.** Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Jikken Dobutsu*, **1991**, s. 40 493–497.
76. **Taşdemir U, Büyükleblebici S, Tuncer PB, Coşkun E, Özgürtaş T ve ark.** Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*, **2013**, s. 66(1):38-4
77. **Todorova T, Pesheva M, Stamenova R, Dimitrov M, Venkov P.** Mutagenic effect of freezing on nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **2012**, s. 29(5):191-9.
78. **Tunalı, UDG.** Sperm Kriyoprezervasyon Teknikleri ve Fertilizasyon Başarısındaki Rolü. *Journal Agent-Androloji*, **2014**, s. 57. 123-128.
79. **Tuncer PB, Çevik M, Demiral ÖO, Kinet H.** Boğa Spermalarının İki Farklı Sulandırıcı ile Dondurulması ve İn Vitro Değerlendirilmesi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, **2005**, s. 2(2): 65-71.
80. **Verheyen G, Nagy Z, Joris H, De Croo I, Tournaye H ve ark.** Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitromatured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertil.* **1997**, s. 67(1): 74-80
81. **Watson PF.** Recent Developments and Concepts in The Cryopreservation of Spermatozoa and The Assessment of Their Post-Thawing Function, *Reproduction Fertility and Development*, **1995**, s. 7(4): 871- 891.
82. **Watson PF.** *Oxford: Oxford Universtiy Press*, The preservation of semen in mammals, *Oxford Reviews of Reproduction Biology*, **1979**, s. 283–351.
83. **Watson PF.** Use of Giemsa Stain to Detect Changes in The Acrosome of Frozen Ram Spermatozoa. *Vet Rec.***1975**, s. 97(1): 12-15.
84. **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**, s. 80(2):874-81.

85. **Woods EJ, Gilmore JA, Liu J.** Cryoprotective Agent and Temperature Effects on Human Sperm Membrane Permeabilities: Convergence of Theoretical and Empirical Approaches for Optimal Cryopreservation Methods. *Hum Reprod*, **2000**, s. 15: 335-343.
86. **Yeste M.** *Theriogenology*. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs, **2016**, s. 85(1):47-64.
87. **Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T.** Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability, and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, **2000**, s. 54 579–585.
88. **Yildiz C, Law N, Ottaviani P, Jarvi K, McKerlie C.** Comparison of sperm quality and DNA integrity in mouse sperm exposed to various cooling velocities and osmotic stress. *Theriogenology*, **2010**, s. 74(8), 1420-1430.
89. **Yildiz C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L, McKerlie C.** Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction*. **2007**, s. 133(3):585-95.
90. **Yokoyama M, Akiba H, Katsuki M, Nomura T.** Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Jikken Dobutsu*, **1990**, s. 39 125–128.
91. WHO Health Organization Organization Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, 4 Cambridge: *Cambridge University Press*. **1999**.

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Ali ARSLANOĞLU İlk ve Orta öğrenimini Meryem Mehmet Kayhan İlköğretim okulunda okudu. Lise eğitimini İbrahim Atalı Çok Programlı lisesinde tamamladı. 2011 yılında Niğde Bor meslek yüksekokulu Laborant ve Veteriner sağlık bölümünü kazandı, birinci güz dönemi sonunda Erciyes üniversitesi Safiye Çıkrıkçıoğlu meslek yüksekokuluna yatay geçiş yaptı ve 2013 yılında Erciyes üniversitesinden mezun oldu. 2013 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı. Bir yıl burada eğitim aldıktan sonra 2014 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesine yatay geçiş yaptı ve eğitimini burada tamamlayarak 2018 yılında mezun oldu. 2019 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2022 yılında eğitimini tamamladı.