



Current Methods Used for Long-Term Storage of Semen[#]

Salih Narlıçay^{1,a,*}, Mehmet Bozkurt Ataman^{2,b}

¹Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, Türkiye

²Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye

*Corresponding author

Derleme

Acknowledgment

[#]Summarized from the corresponding author's PhD seminar.

History

Received: 12/11/2022

Accepted: 17/12/2022

ABSTRACT

In the field of reproductive biotechnology, many methods have been developed for long-term storage of semen obtained from animals. When these methods are compared with each other, advantages and disadvantages emerge. There are still deficiencies in cryobiology, and for this reason, trials have been carried out on current methods of freezing semen. Large volumes of semen (2-10 ml) can be stored at once thanks to directional freezing. In the encapsulation method, there is a gel-like structure surrounding the cells. The storage method called lyophilization is a drying process and organisms, cells, tissues and even all biological products can find a place in this group. Recommended sperm storage methods have been developed for species-specific or endangered organisms. The disadvantage of all storage methods is that they need some form of liquid nitrogen. The common denominator of all the studies carried out is to aim for long-term storage of the motile male germ cell, which can somehow preserve its viability. In addition, there is no discovery that genetic material will not be damaged, including in current methods.

Keywords: Cryobiology, Directional Freezing, Encapsulation, Lyophilization, Reproductive biotechnology

Spermanın Uzun Süreli Saklanması Kullanılan Güncel Yöntemler

Bilgi

[#]Sorumlu yazarın doktora seminerinden özetlenmiştir.

Süreç

Geliş: 12/11/2022

Kabul: 17/12/2022

Copyright



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

ÖZ

Üreme biyoteknolojisi alanında hayvanlardan elde edilen spermayı uzun süreli saklamak için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler birbirleri arasında kıyaslandığında avantajları ve dezavantajları ortaya çıkmaktadır. Kriyobiyolojik açıdan hala eksikliklerin olduğu, bunun için spermanın dondurulmasında güncel metotlar üzerinde denemeler gerçekleştirilmiştir. Hacimsel olarak fazla miktarda sperma (2-10 ml) tek seferde yönlü dondurma sayesinde saklanabilmektedir. Enkapsülasyon yönteminde hücrelerin etrafını saran jel benzeri bir yapı söz konusudur. Liyofilizasyon olarak adlandırılan saklama yöntemi ise bir kurutma işlemidir ve organizmalar, hücreler, dokular hatta bütün biyolojik ürünler bu grupta kendine yer bulabilmektedir. Türe özgü ya da nesli tükenmekte olan canlılar için tavsiye edilen sperma saklama yöntemleri geliştirilmiştir. Bütün saklama yöntemlerinin dezavantajı ise sıvı azota bir şekilde ihtiyaç duymalarıdır. Yapılan bütün çalışmaların ortak paydası, bir şekilde canlılığını koruyabilecek motil erkek eşey hücresinin uzun süreli olarak saklanmasını amaçlamaktır. Güncel yöntemlerde dahil olmak üzere genetik materyalin zarar görmeyeceği bir keşif söz konusu değildir.

Anahtar Kelimeler: Enkapsülasyon, Kriyobiyoloji, Liyofilizasyon, Reprodüktif biyoteknoloji, Yönlü Dondurma

Giriş

Günümüzde bilimin keşfetme arzusu, sürekli gelişen teknoloji ile birlikte daha elverişli ve kaliteli olanı istemesine yol açmaktadır. Bunun için hala farklı yöntemleri ve metotları kullanarak arayışlarını sürdürmektedir.

Pek çok alanda bilimsel çalışma imkanına sahip olan bilim adamları keşfettiği buluşları insanoğlunun kullanımına sunmuştur. Bu keşiflerin bazıları da canlılığın ve yaşam süresinin nasıl uzatılabileceği ile ilgili olmuştur. Bu çalışmaların bir kısmı değişik tipteki hücrelerin, dokuların, organların dondurulup bir süre bekletildikten sonra çözülüp hücrelerdeki fiziksel ve kimyasal farklılıkları inceleyen ve yıllarca saklama üzerine çalışmalara konu olan "kriyobiyoloji" bilimini esas almaktadır.

Üreme biyoteknolojisi alanında çalışarak elde ettiğimiz, genetik üstünlüğü olan spermatozoon, oosit ve embriyo gibi materyalleri dondurup yüzyıllar sonrasında bile kullanmayı amaçlamaktayız.

Suni tohumlama çalışmalarının etkili olabilmesi spermanın muhafaza edilebilir ve istenilen yere götürülebilir olmasına bağlıdır. Bu da spermanın özellikle uzun süreli muhafazası ile sağlanabilir. Hala bazı türlerde spermanın dondurulması konusunda başarılı sonuçlar alınmadığı için konu güncelliğini korumakta ve yeni çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir. Yapılan çalışmalar ve ortaya çıkan sonuçlar ele alınmış olup, spermanın dondurularak saklanması hangi yöntemin ya da yöntemlerin daha başarılı olduğu incelenmiştir.

Evcil Hayvanlardan Sperma Alınması

Evcil bir erkek damızlık hayvandan, çeşitli biyoteknolojik çalışmalarda kullanılması için, belirli yöntemler ışığında kaliteli ve maksimum sayıda spermatozoon içeren ejakülat olarak tabir edilen sperma alınmaktadır. Suni vajen ve elektroejekülatör (EE) bu yöntemler arasında en sık olarak tercih edilenleridir. Suni vajen yöntemi; basit, hızlı ve iyi kalitede sperma elde etme açısından daha çok tercih edilmektedir. Fakat bazı türlerde sperma alınırken hayvanın aşım sezonu ile sınırlı olması kalması veya suni vajene alışık olması gerekmektedir. Bu şartlar yerine getirilemeyen türlerde EE yöntemi kullanmak zaruri hale gelmektedir. Ancak bu yöntemin hayvanı rahatsız edici olması ve daha fazla iş gücüne ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Evans ve Maxwell, 1987; Yurdaydın, 1994; Cupps, 1991).

Sperma alma merkezlerinde boğa, aygır ve domuzlardaki cinsel uyarımı sağlamak için genellikle suni vajen görevi gören bir fantom kullanılmaktadır. Erkek damızlıktan sperma almak ve alınan spermanın değerlendirilmesinin yapılabilmesi için ejakülasyona yardımcı olacak dişi bir hayvan ya da maket bir ekipman kullanılmaktadır. Boğa ve aygırlarda uygun bir şekilde hazırlanmış suni vajen kullanılarak ejakülasyon refleksi sağlanabilmesine (Love, 1992; Mathevon ve ark., 1998) karşın, domuzlarda ve köpeklerde ejakülasyon genellikle elle masaj yöntemi kullanarak uyarımda

bulunabilmektedir. Özellikle erkek köpekler söz konusu olduğunda sperma alma işlemi ideal bir ortam ve sıcaklıkta, dişi köpeğin kokusunu alması sağlandığında mümkün olabilmektedir (Colenbrander ve ark., 1993; Kutzler, 2005). Özel durumlarda elektro ejakülasyon uygulaması diğer türlerin aksine, geviş getiren hayvanlarda (sığır, koyun, keçi) anestezi gereksiz olduğunda iyi sonuçlar verebilmektedir. (Gunn, 1934; Hill ve ark., 1956; Palmer ve ark., 2005)

Eskiden kullanılan bazı sperma alma yöntemleri artık tercih edilmemektedir. Kısaca bu yöntemlerin isimlerinden bahsedecek olursak eğer; (İleri ve ark., 2000)

- Ampulların masajı ile spermanın alınması
- Tabii aşımdan sonra spermanın vajinadan alınması
- Vajinaya sünger veya prezervatif yerleştirilerek spermanın alınması
- Penise prezervatif geçirilerek spermanın alınması
- Şirurjikal yöntemle spermanın alınması

Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi

Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi pratikte kolay uygulanabilir olması açısından önem arz etmektedir. Yapılan bu spermatolojik testler birbirini izleyen süreçleri doğrudan etkilemektedir. Spermanın fertilité oranları hakkında, erkek damızlık seçiminde ve suni tohumlama uygulamalarını garanti kapsamına almaktadır (Demirci, 2002).

Spermanın muayenesi makroskopik, mikroskopik, fiziko-kimyasal, biyolojik ve mikrobiyolojik olarak sınıflandırılabilir (Sönmez, 2012).

Spermanın mikrobiyolojik muayeneleri; in vivo ya da in vitro olarak bulaşabilecek mikroorganizmaların tümünü kapsayacak şekilde muayene ile etken tespiti yapılmaktadır (Sönmez, 2012).

Spermatolojik nomenklatör; spermatolojik muayenelerde uluslararası alanda standart terimlerin kullanılması tanıyı kolaylaştırır ve fayda sağlamaktadır (Çoyan ve ark., 2002).

Hayvanlardan Alınan Spermanın İşlenmesi ve Sulandırılması

Spermanın erkek hayvanlardan alındığı andan başlayıp, östrusta bulunan dişi hayvanın genital kanalına bırakılmasına kadar geçen süre ve bu zaman içerisinde yapılan işlemler suni tohumlama uygulamalarının başarısını oldukça etkilemektedir (Çoyan, 2005).

Spermanın 5°C'de saklanması ya da dondurulmasında çeşitli sulandırıcılar kullanılmaktadır. Sperma sulandırıcılarının kullanılmasının başlıca amaçları; spermanın hacmini artırarak, suni tohumlama işleminde kullanılmak üzere spermayı eşit sayıda spermatozoon bulunduracak yeterli spermatozoona indirgemek ve bu sayede daha fazla suni tohumlama yapılmasına imkan sağlamaktır. Spermatozoonların canlılığını daha uzun süre devam ettirebilmesi adına besin maddeleri içermelidir. Spermaya eklenen sulandırıcılar, ortam ısısı düşürülürken

spermatozoonların soğuk şokundan etkilenmemesini sağlayabilmelidir. Mikrobiyal kontaminasyonları önlemeli ve kontrol altında tutmalıdır. Spermatozoonlar tarafından üretilen metabolizma artıklarını etkisizleştirmek ve pH değişimlerine karşı tamponlama özelliğine sahip olmalıdır (Sönmez, 2012).

Sulandırıcılara katılan başlıca maddeler: **Kimyasal (Tampon/Buffer) Solüsyonlar**

Sperma sulandırıcıları arasında esas ana görevi üstlenmekte olan kimyasal solüsyonlar, içeriğinde bulundurduğu maddeler ve tamponlama özellikleri sayesinde oldukça önem arz etmektedirler (Sönmez, 2012).

Fosfat buffer solüsyonu; 1939 yılında keşfedilen, spermatozoonlar için tamponlama özelliği olan, ilk sperma sulandırma solüsyonudur. Diğer solüsyonlar kadar güvenilir olmasına rağmen yumurta sarısı ile karıştırıldığında şeffaf olmayan bir çözeltiye dönüştüğü ve spermatozoonların mikroskopta net görünüm vermemesine neden olmaktadır (Sönmez, 2012).

Sodyum sitrat buffer solüsyonu; 1941 yılında keşfedilmiştir. Sulandırıcının hazırlanması sırasında yumurta ile bu solüsyon karıştırıldığında spermatozoonların yeteri kadar görülmesine olanak sağlayan saydamlık vermektedir (Sönmez, 2012).

Tris buffer solüsyonu; spermatozoonun içerisine yerleşebilmesi ve pH değişimlerine karşı hücreler arası tamponlama özelliğinin olması nedeniyle spermanın saklanması için çok önemli bir yere sahiptir. Tris'in sperma sulandırıcılarında, farklı oranlarda molariteleri ve pH dereceleri denenmesinin ardından 10-50 mM arasında değişen yoğunluklarda kullanılması spermatozoonun fertilitesi olumsuz etkilemediği anlaşılmıştır. Birçok hayvan türünün (ruminant, kedi, köpek ve domuz gibi) sperma sulandırılmasında Tris (hidrosimetilen) aminomethane tampon solüsyonu olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Sönmez, 2012; Koçyiğit ve Uslu, 2016).

Kryoprotektan maddeler

Dondurma ve çözdürmeye bağlı yaşanan ani ısı değişimlerine karşı spermatozoonları soğuk şoku hasarına, intraselüler kristal oluşumuna, çözdürme esnasında dekristalizasyona ve gelişen membransel destabilizasyona koruma amacıyla spermaya sulandırıcılara ayrıca bazı kimyasal maddeler de ilave edilmektedir. Bu maddeler "kryoprotektif maddeler" olarak nitelendirilmektedir (Bucak ve Tekin, 2007).

Kryoprotektanlar donma noktasını düşürerek, numunelerde sıvı kısmın miktarını artırarak tuz ve solütlerin oranını azaltarak ve spermada hem hücre içinde hem de hücre dışında buz oluşumunu baskılayarak etki etmektedir (Royere ve ark., 1996). Biyolojik yapılarda membran fosfolipidlerinin arasındaki hidrojen bağlarına su molekülleri içerdikleri oksijen atomu vasıtasıyla bağlanırken, gliserol gibi kryoprotektan maddeler suyun yerini alır (Crowe ve Crowe, 1984).

İnternal ve eksternal kryoprotektanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadırlar. Bu maddeler arasında hücre içine

girerek etki gösteren en önemli madde Gliserol'dür. Dondurma işlemleri sırasında gerçekleşen en önemli olay hücrenin kristalleşmesidir. Buna bağlı olarak pH'da değişimler ve hücre membranında yırtılmalar meydana gelebilmektedir. Yaygın olarak sperma sulandırıcılarının içerisine %3 ila %10 arasında değişen oranlarda ilave edilmektedir (Bucak ve Tekin, 2007).

Bir tuz olan Dimetilsülfoksit (DMSO) soğuk şokuna karşı spermanın korunması amacıyla sulandırıcılara katılan, önemli tamponlama kabiliyetine sahiptir. İnternal kryoprotektan görevi gören DMSO membran bütünlüğünü koruma açısından çok fayda sağlamaktadır. Gliserol ve DMSO dışında ethilen glikol ve propilen glikol'da kryoprotektif madde olarak sperma sulandırıcılarının içerisine belirli miktarlarda katılabilmektedir (Bucak ve Tekin, 2007; Alçay ve ark., 2015).

Bunlar dışında hücre içerisine giremeyen, eksternal kryoprotektan olarak adlandırılan ve spermatozoon için enerji ihtiva edecek sukroz, trehaloz, rafinoz ve laktoz gibi bazı şekerlerin de sperma sulandırıcılarına katılabileceği bildirilmektedir.

Gliserol yerine kullanılan kryoprotektif özellikteki maddelerin hiçbiri gliserol kadar faydalı sonuçlar vermemiştir (Uçan, 2014).

Şekerler: Sperma sulandırıcılarına katılan şekerlerin spermatozoonlar için temelde iki amacı vardır. Bunlardan ilki enerji kaynağı olarak kullanılmasıdır. İkincisi ise ekstrasellüler sıvıda bulunması nedeniyle osmotik basınç ve spermatozoonun membran bütünlüğünün korunması açısından çok fayda sağlamaktadır. Spermatozoonun başlıca enerji kaynağı früktozdur. Ayrıca glikoz ve mannoz ilave edildiğinde de spermatozoonlar bu şekerleri metabolize edebilmektedirler. Bunlar dışında var olan şekerler enerji kaynağı olarak kullanılmamaktadır.

Yumurta sarısı: Spermanın saklanması görev alan yumurta sarısı, sperma ısısının 35°C'den 5°C'ye düşürülmesinde oluşacak soğuk şokuna karşı bariyer görevi sağlarken, hücre içi enzimlerin ise hücre dışına çıkmasını yol açar. Yumurta sarısının içeriğinde yer alan lecithin, B-lipovitellin gibi fosfolipid ve lipoproteinleri bulundurması soğuğa karşı koruyucu etkisini ortaya çıkarmaktadır. Yumurta sarısında bulunan yüksek antioksidan içerik, spermatozoonlardaki lipit peroksidasyon oranını belirli ölçülerde azalttığı bilinmektedir ve bunu sadece dondurma işlemi sırasında değil her zaman yapmaktadır.

Keçiler için yumurta sarısı özel bir durum ihtiva etmektedir. Yumurta sarısının içeriğinde bulunan lecithin seminal plazmada bulunan koagulant enzimi (EYCE, trigilesrol fosfolipaz A) ile reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan yağ asitleri ve lysolecithin maddesi spermatozoonlar üzerinde toksit etki oluşturmaktadır (Sönmez, 2012)

Süt: İnek sütünden elde edilen sulandırıcı ilk olarak 1950 yılında bilimsel çalışmada kullanılmıştır. Taze süt, 92-95°C'de 10 dakika kadar ısıtılması gerekmektedir. UHT sistemiyle üretilen sütlerde bu işlemin uygulanmasına gerek yoktur. Süt içerisinde yer alan ve spermatozoonlara zarar veren lactenin isimli madde ısı işlem sonucu inaktif hale gelmektedir (Uçan 2014).

Antimikrobiyal maddeler

Hayvanlardan elde edilmiş spermada bulunan mikroorganizma sayısı değişkenlik gösterebilmektedir. Bu sayı, ejakülat alınmadan önce yapılan çevre temizliği ve prepisyum temizliği azaltılabilmektedir. Ayrıca sperma alınırken ve işlenirken kullanılan tüm malzemelerin steril olması bu durumu oldukça hassas bir hale getirmektedir.

Bu mikroorganizmalar genellikle apatojen olmasına karşın enerji kaynağını çok fazla tüketmesi, hatta spermatozoonlar ile yarışa girmesine neden olmaktadır.

Bu tür etkilerin önlenmesi ve veneral hastalıkların mücadelesi için sperma sulandırıcılarını katılan antibiyotik maddeler fertilitenin artırılması açısından çok önemli olduğu bilinmektedir (Özkoca, 1984). Sperma üzerinde denenen çoğu antibiyotik madde spermatozoonlar üzerinde toksik etki gösterirken bazıları da mikrobiyal bulaşmayı engellemede yetersiz kalmaktadır. 1940'lardan bu yana penisilin ve streptomisin spermadaki patojen ve apatojen bakterileri kontrol etmek için hala kullanılmaktadır. Bunun dışında değişik türlerde gentamisin, tylosin, linkomisin, spektinomisin gibi antibiyotiklerde denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Evcil Hayvanlardan Alınan Spermının Saklanması

Sperma dondurulması üzerine yapılan ilk çalışmalar Spallanzani (1776) tarafından kurbağa, aygır ve insan ejakülatı ile denenmiştir. Bu çalışmalarda dondurma işlemleri kar içinde yapılmıştır. Ejakülatın ısı düşüldükçe spermatozoonları hareketsizleştirip inaktif hale getirmiştir, ayrıca tekrar ejakülat ısı artırılmaya başlandıkça spermatozoonların eski hallerine döndüğü anlaşılmıştır. (Maxwell ve Salamon, 1993).

Spermanın saklanması baz alınan nokta, spermatozoonun fertil ömrünü uzatmak için metabolizmasını yavaşlatmak ve hareket ederek harcayacağı enerjiyi azaltmaktır. (Wetzels ve ark., 1996). Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre spermayı iki şekilde saklayabilmek mümkündür. Bunlardan birincisi spermının sıcaklığını düşürerek sıvı formda kısa süreli saklamak, ikincisi ise 0°C'den daha düşük sıcaklıklarda dondurarak uzun süreli saklamaktır (Ak, 2000).

Sulandırma İşlemi

Spermanın dondurularak yani uzun süreli olarak saklama işlemi birbirini takip eden çeşitli aşamalardan geçerek yapılmaktadır.

Ön sulandırma

Taze spermının sulandırma oranı hesaplanarak istenen hacimde hazırlanmış ve gerekli antibiyotikler ilave edilmiş sulandırıcı su banyosunda dereceleri eşitlenerek (35°C) kademeli bir şekilde sperma ile birleştirilmektedir (Sönmez, 2012).

Soğutma işlemi

Ön sulandırılması yapılmış 2-3 saat içerisinde kademeli olarak 35°C'den 5°C'ye kadar soğutulmaktadır. Eğer

sulandırılması yapılmamış taze spermalar üzerinde böyle bir soğutma denenirse çoğu oluşan soğuk şoku nedeniyle ölecektir. Sulandırıcıların içerisinde bulunan lecithin ve lipoproteinler soğutma esnasında hücre membranının permeabilitesindeki değişiklikleri önlemektedir (Sönmez, 2012).

Soğutma hızı

İki aşamalı bir şekilde yapılmaktadır. İlk aşama daha hızlı bir şekilde 2 dakikada 1°C olacak şekilde 20°C'ye kadar düşürülerek gerçekleştirilmektedir. Soğutma sırasındaki kritik sıcaklık derecelerinden birisi 20°C ile 5°C arası olduğu bilinmektedir. Bu dereceler arası ani sıcaklık değişimleri akromozal bozukluklara ve motilite kaybına neden olmaktadır. Bunun için soğutma işleminin ikinci aşaması mümkün olduğunca yavaş bir şekilde yani 6-8 dakikada 1°C olması tavsiye edilmektedir (Sönmez, 2012).

Gliserilizasyon

Ön sulandırılması yapılmış taze spermaya gliserol katılması işlemine gliserilizasyon adı verilmektedir. Dondurma ve çözündürme esnasında hücrenin hem içinde hem de dışında oluşan kristaller hücrenin membransel yapısına zarar vermektedir. Ön sulandırma işlemi yapılmış spermaya katılan gliserol hücre içinde bulunan su ile yer değiştirerek donma derecesini düşürmekte ve daha az buz kristalini oluşmasını sağlamaktadır. Gliserol oranının sulandırıcıdaki maddelerinin oranına göre değişiklik göstermektedir. Gliserol ilavesi 5°C'ye düşürülmüş ön sulandırılması yapılmış taze spermaya kademeli olarak aktarılmaktadır (Sönmez, 2012).

Equilibrasyon

Her hangi iki şey arasında denge kurma, adaptasyon sağlama anlamına gelmektedir. Ön sulandırması ve soğutma işlemi yapılmış 5°C'deki spermaya gliserol ilave edildikten sonra madde alışverişi ve ortam dengesi sağlanması beklenmektedir. Bu süreç tamamlandıktan sonra dondurma işlemine başlanmaktadır (Sönmez, 2012).

Spermanın Dondurulması (Kriyobiyoloji)

Üremenin ilerlemesiyle birlikte yüksek verimli genlerin hızla çoğalması, bugünlerde birinci sınıf popülasyonların oluşmasına yol açmaktadır. Bu ilerlemenin esas nedeni suni tohumlama uygulamasının yaygınlaşmasından kaynaklanmaktadır. Bu hedeflere suni tohumlama sayesinde ulaşılmış olsa da, spermının uzun süreli saklanması ve neredeyse sayısız kez kullanılmasına olanak sağlanması bunun temel nedenidir. (Pesch ve Hoffmann, 2007)

Spermanın fertilitite yeteneğini yitirmeden uzun süre saklanabilmesi ancak dondurulması ile mümkün olabilmektedir. Spermatozoonların hem dondurma hem de çözündürme esnasında ısı değişimine maruz kalması fertilitite yeteneğini olumsuz etkilemektedir (Schroeder ve ark., 1990). Spermatozoonlar en çok -15°C ile -60°C arasında zarar görmektedir.

Hücre saklanması -80°C'nin üstündeki sıcaklıklarda tam anlamıyla donmamış farklı iyon yoğunluklarına sahip solütlerin bulunmasından dolayı, hücresel faaliyetlerine devam ederek, zamana bağlı olarak fonksiyonel bozulma

yaşanmaktadır. Bulunduğu ortam ısı, hücre tipi ve dondurma medyumuna bağlı olarak saatte bir ya da yılda bir hücre ölümleri görülebilmektedir.

Teorik olarak bir hücre için biyolojik zamanın durması -196°C'de sağlanabilmektedir. Tahmini olarak 4000 yıl saklanabilmektedir (Mazur, 1984).

Kuru Buz Üzerinde Spermanın Dondurulması (Pellet Yöntemi)

Bütün işlemlerden geçirilmiş dondurulmaya hazır 5°C'deki sperma, büyük bir disk şeklindeki -79°C'de olan kuru buz (katı CO₂) kalıbı üzerinde özel matkapla açılan yuvarlak oyuklara bir enjektör yardımıyla doldurulmaktadır. Bu işlem yapıldıktan çok kısa bir süre sonra -79°C donması sağlanmaktadır. Kuru buz üzerindeki çukurcuklarda donan tablet şeklindeki spermalara pellet adı verilmektedir. Elde edilen bu pellet şeklindeki yapılar toplanarak özel taşıma kapları içerisinde -196°C'deki sıvı azot tankına yerleştirilmektedir. Hazırlanan bu pelletlerde bulunan motil spermatozoon sayısı normalin 10 misli olacak şekilde hazırlanmaktadır. Kullanılan hacim genellikle 0,1 ml olmaktadır. Tohumlamada kullanılmadan önce uygun dozların elde edilebileceği sperma sulandırıcılarına pelletler eklenerek eritilip, tohumlamada kullanılmaya hazır hale getirilmektedir (Visser, 1974).

Bu yöntemin iki büyük dezavantajı vardır. Birincisi bireysel olarak teşhis etmede güçlük yaşanması, ikincisi ise kontaminasyona maruz kalmada riskler taşımasıdır. Ayrıca pelletleri tutmak için kullanılan pensler, farklı boğalardan alınan spermatozoonlar ile birbirine karışmasına da yol açabilmektedir (Salamon ve Maxwell, 2000).

Etil Alkol ve Kuru Buz Yardımıyla Spermanın Dondurulması (Ampul Yöntemi)

Dondurulmaya hazır sperma, 1 ml hacmindeki plastik veya cam ampullere doldurulduktan sonra telden yapılmış özel sepetler içerisinde etil alkol banyosuna bırakılır. Etil alkol içerisine kuru buz atılarak 5°C'ye düşmesi sağlanmaktadır. Dondurma işlemi ise iki aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk olarak 5°C'den -20°C'ye dakika 1-2°C düşürülmektedir. Bu işlem etil alkol banyosu içerisinde yer alan pervaneler sayesinde hızlı ve eşit sıcaklıkta olacak şekilde yapılmaktadır. İkinci aşama ise -20°C'den -79°C'ye mümkün olan en hızlı şekilde yeterli miktarda kuru buz atılarak yapılmaktadır (Blackshaw, 1955). İlk aşamada ortam ısı kademeli ve yavaş bir şekilde düşürülmezse ampullerdeki spermatozoonlar soğuk şokundan zarar görerek etkilenebilir hatta bütün spermatozoonlar ölebilmektedir. Ampul içerisinde dondurulan spermalar -79°C'de kullanılacağı zamana kadar saklanabilmektedir.

Bu yöntemde eksilen kuru buzun ikmalisi sık sık yapılmalıdır. -79°C'de uzun süre saklanması zor olacağı için spermanın bulunduğu ampullerin sıvı azot tankında tutulması daha uygun olacaktır. Bazı çalışmalar karşılaştırıldığında elde edilen verilere göre dondurulmuş ampullerle yapılan tohumlamalarda, ilk 1-2 ayda yapılan tohumlama ile 6. ayda yapılan tohumlama arasında %13'lük bir verim kaybı olduğu anlaşılmaktadır.

Sıvı Azot Buharında Spermanın Dondurulması (Payet Yöntemi)

Günümüzde kullanılan en yaygın ve en pratik dondurma yöntemidir. Tekniğe göre uygun bir şekilde hazırlanmış, dondurulma işlemine geçilecek sperma, 0,25 ml veya 0,5 ml hacimli plastik payetler içerisine çekildikten sonra açık kalan ucu ısı ve basıncın etkisi ile ezilerek kapatılır. Sperma ile dolu payetler alüminyum veya çelikten bir raf üzerine tek sıra halinde taraklara yerleştirilmektedir. Rafın ağız geniş sıvı azot tankında bulunan azot seviyesinin 5,5-6 cm üzerinde bulunan özel ızgaralar üzerine dizilerek -110°C ile -120°C arasındaki sıvı azot buharında 7 dakika boyunca dondurulmaya bırakılır. Daha sonra burada gobletlere yerleştirilir ve -196°C'deki sıvı azot içerisinde depolanır (Şekil 1).

Tavsiye edilen diğer bir yöntem ise, sıvı azot buharında dondurulması iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak sıvı azot seviyesinden 16 cm yukarıda 2 dakika bekletilir, daha sonra 4 cm kalacak şekilde yaklaşık 3 dakika tutulmaktadır. Daha sonra diğer yöntemde de olduğu gibi gobletlere yerleştirilir ve -196°C'deki sıvı azot içerisinde depolanır (Demirci, 2002).

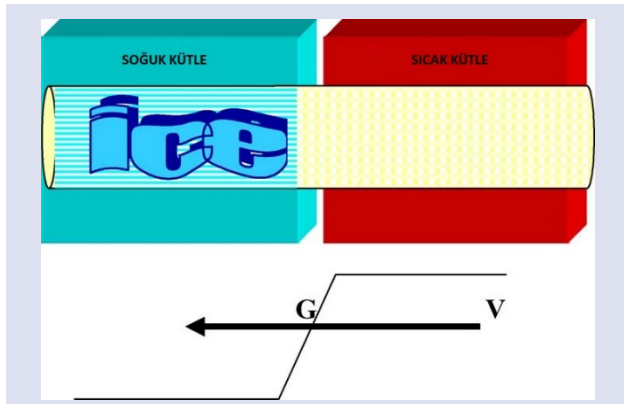


Şekil 1. Sıvı azot seviyesinin 5 cm yukarısında taraklara dizilmiş payetlerin 7 dakika sürede dondurulması ve sıvı azot içine atılması işlemi
Figure 1. The process of freezing the straws lined up on combs 5 cm above the liquid nitrogen level in 7 minutes and throwing them into liquid nitrogen.

Yönlü Dondurma Yöntemi (Directional Freezing)

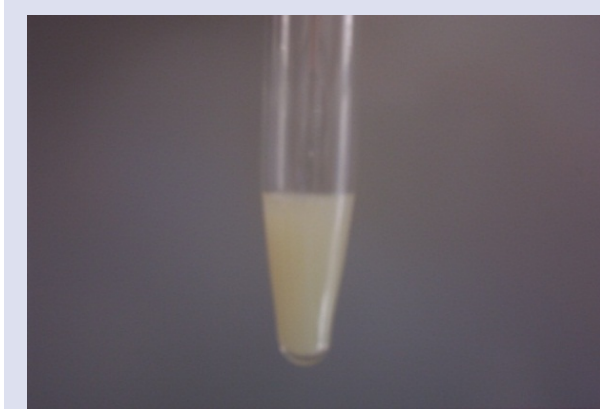
Yönlü dondurma tekniği, spermatozoonlara herhangi bir mekanik hasar vermeden çok fazla miktardaki spermayı bir cihazla dondurabilen bir yöntemdir. Günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan sperma dondurma işlemi, hacim olarak 5 ml veya daha küçük hacimli numuneler için uygundur. Bunun nedeni, büyük hacimli dondurma işlemlerinde numunenin dış kısımlarının diğer kısımlardan daha hızlı soğuması veya ısınması gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Yönlü dondurma, basit bir termodinamik prensibe dayanmaktadır (Rubinsky ve Ikeda,

1985). Buz kristalleri, Multi Thermal Gradient cihazı aracılığıyla sperma hareketinin hızını hassas bir şekilde düzenleyerek kontrol etmektedir (Arav, 1999). Spermatozoon içerisindeki suyun hücre dışına yayılmasına izin vererek hücre içi buz oluşumunu engellemektedir. Aynı zamanda ekstra hücrel buz oluşumunu azaltarak hücredeki mekanik hasarı en aza indirmektedir. Ek olarak, daha hızlı dondurma işleminin gerçekleşmesi sayesinde ozmotik stresin azalması sağlanmaktadır. Bu teknikte düşük gliserol yoğunluğuna ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sayede, spermatozoonlar kriyoprotektanların toksisitesinden korunabilmektedir (Arav ve Saragusty, 2016) (Şekil 2). Yönlü dondurma yönteminde 2 ml'den 10 ml'ye kadar değiştirilebilen tüpler kullanılabilir. Bu tüplerdeki spermalar doğrusal bir düzlem üzerinde belirli bir hızda hareket ettirilerek 5°C'den -50°C'ye düşürülmektedir. Daha sonra bu tüpler sıvı azot tankında saklanabilmektedir (Şekil 3).



Şekil 2. Yönlü dondurmanın işleyişi G:Eğim V:Hız (Gacitua ve Arav, 2005)

Figure 2. Mechanism of directional freezing G: Gradient V: Velocity

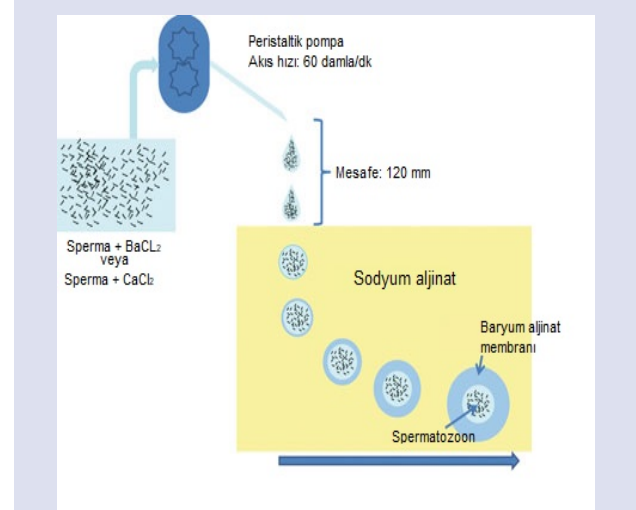


Şekil 3. Sperm miktarı (Kalkan ve Uçar, 2022)
Figure 3. Semen volume

Enkapsülasyon Yöntemi

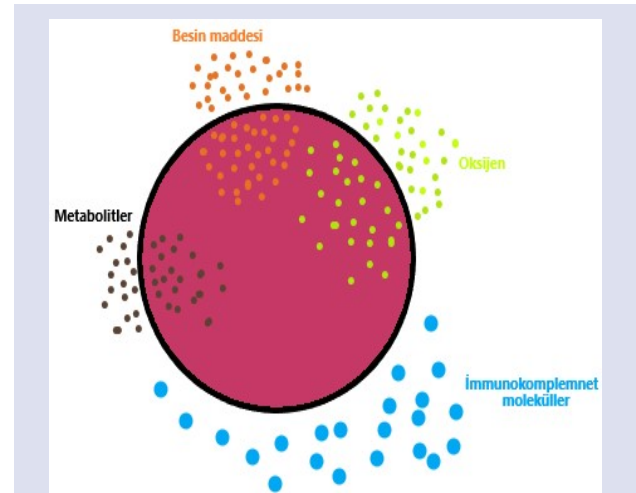
Son 30 yılda, suni tohumlamadan sonra spermatozoon kaybını en aza indirmek için farklı türlere kapsülleme teknolojisi üzerine çalışılmaktadır. Mikrokapsülleme, moleküllerin çift yönlü difüzyonuna izin veren polimerik yarı geçirgen bir zarda hücreleri, dokuları ve maddeleri

sarma işlemi olarak söylenebilmektedir. Spermatozoon kapsülleme için bir dizi farklı polimer mevcuttur. Polimerler, hücrelerin etrafını sarar ve yumuşak, jel benzeri bir yapı oluşturur. Polimer olan aljinatlar bir polisakarittir ve esas olarak kahverengi alglerin ekstraktından elde edilmektedir. Kapsülün membran kısmı besin, oksijen vb. içeri girmesine, metabolitlerin ise dışarı akışına izin vermektedir. Ayrıca kapsülün dışında bulunan immüno-komplement molekülleri bloke etmektedir (Perteghella ve ark., 2015). (Şekil 4,5).



Şekil 4. Kapsül oluşum mekanizması (Fausitini ve ark., 2015)

Figure 4. Capsule formation mechanism

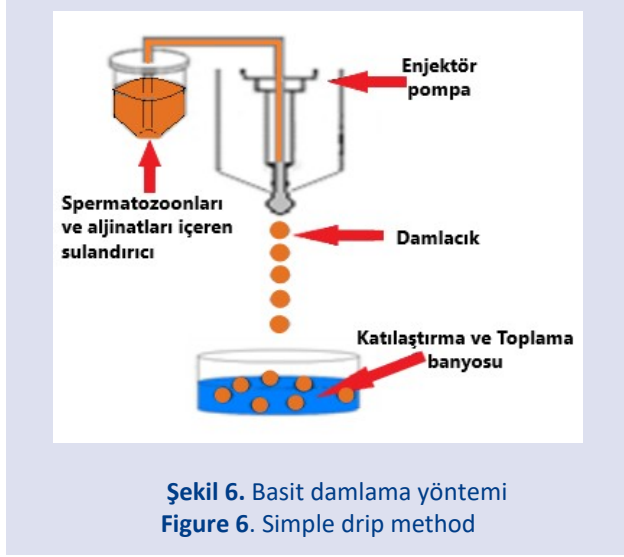


Şekil 5. Kapsül membranının işlevi
Figure 5. Function of the capsule membrane

Enkapsülasyon makinasının temeldeki amacı yuvarlak şekilli damlacıklar oluşturarak bunları beherin içinde toplamaktır. Spermatozoon ve aljinat karışımı çözelti, sulu çekirdek sıvısına gelmektedir.

Bu damlacıkları oluşturmak için 3 farklı yöntem kullanılmaktadır. İlk olarak basit damlama yöntemi, enjektör pompası yardımı ile sulu çekirdek sıvısına yuvarlak şekil aldırılmaktadır. Oluşan bu yuvarlak şekilli

damlacıklar kalsiyum klorür ve baryum klorürlü ($BaCl_2$ veya $CaCl_2$) çözeltinin içinde bırakıldığında spermatozoonların bulunduğu damlacık etrafında hemen yumuşak, pürüzsüz ve parçalanabilir bir polimer duvarı oluşturmaktadır. Bu polimer duvar, kalsiyum ve baryum içerdiği iyonlar ile polimer etkileşime girerek oluşmaktadır (Gadella ve Luna, 2014). (Şekil 6).



Şekil 6. Basit damlama yöntemi
Figure 6. Simple drip method

İkinci yöntem ise elektrostatik ekstrüzyondur ve damlacıklar elektrotlardan arasından geçerken yuvarlak şekle bürünmektedir. Behere damlacıklar düştüğünde, polimerik duvarlı spermatozoon manyetik karıştırıcı yardımıyla daha iyi oluştuğu görülmektedir. (Şekil 7)

Üçüncü yöntem, koaksiyel hava akımıdır. Koaksiyel hava akımı sisteminde sağ ve sol taraftan gelen hava akımı sayesinde damlacıklar yuvarlak şekli almaktadır. (Şekil 8) Kapsüllerden spermatozoonun kademeli olarak sızması, fertilité bölgesine doğru düzenli bir akış sağlamaktadır. Özellikle, yaban domuzu spermatozoonları baryum aljinat membranında taşınarak, polispermi riskini azaltmak ve in vivo fertilitasyon verimini optimize etmek için uygun bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır (Okere ve Nelson, 2002).



Şekil 7. Elektrostatik ekstrüzyon yöntemi
Figure 7. Electrostatic extrusion method



Şekil 8. Koaksiyel hava akımlı yöntem
Figure 8. Coaxial airflow method

Liyofilizasyon Yöntemi (Dondurarak Kurutma Yöntemi)

Evcil hayvanların, nesli tükenme tehlikesi altındaki hayvanların ve vahşi hayvanların spermatozoonu ile biyolojik ürünlerin korunmasını sağlamakta kullanılan tekniktir. Uygulama alanı olarak çok geniş bir yelpazeyi barındırmaktadır. Bunlara örnek verilecek olursa akla gelebilecek tüm mikroorganizmalar, bazı besinler, biyolojik ürünler (spermatozoon, eritrosit, plazma, serum, aşı gibi) ve organ naklinde kullanılmak üzere bazı dokuların taşınması ve saklanması için kullanılabilir (Baştan ve Akçay, 2019).

Hücrelerin içerisinde barındırdığı su hücrenin yaklaşık %70-90'ını oluşturmaktadır. Su hücreler için yeri geldiğinde biyokimyasal ve metabolik aktivitelerini devamını sağlayan bir çözücü olduğu gibi, yeri geldiğinde ise hücrelerin bozulmasında ve otolizinde görev alan bir moleküldür. (Billy ve Potts, 2001; Gil ve ark., 2014).

Spermatozoonun liyofilizasyonu ya da kurutarak dondurma işlemi aşamalardan oluşmaktadır. Liyofilizasyon için taze, dondurulmuş ya da epididimal sperma kullanılabilir. Spermatozoonun liyofilizasyona hazırlanması için bazı işlemlerden geçmesi gerekmektedir. Liyofilizasyona başlamadan önce spermatozoonu bulunduğu ortamdaki seminal plazma veya sperma sulandırıcılarından ayrıştırılması gerekmektedir. Bu seperasyon işlemi swim up ya da percoll gradient yöntemi ile yapılabilmektedir. Koç sperması için bunu yapmak önerilmemektedir. Çünkü spermatozoonlar ayrıştırma işlemleri sırasında dış etkenlere karşı aşırı hassas olduğu bilinmektedir. Koçlardan alınan spermada liyofilizasyon işlemi ayrıştırılmadan yapılmaktadır.

Liyofilizasyon işleminde kullanılmak üzere sperma sulandırıcısı olarak fetal siğir serumu (FBS), monosakkarit veya disakkarit şekerler, sodyum pürivat, L-glutamin, EDTA (etilen diamin tetra asetat), aminoasitler ve antibiyotik içeren çeşitli tampon, besin ve koruyucu maddeleri içeriğinde bulduran ticari veya hazırlanmış

sulandırıcılar kullanılabilir. Bununla ilgili yapılan bazı liyofilize spermatozoon çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edildiği görülmektedir (Gil ve ark., 2014). Sulandırılan spermalar 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ekilibrazyona bırakılmaktadır. Bu işlem sonucunda istenilen millilitrede istenilen spermatozoon yoğunluğuna göre cam veya plastik kriyojenik tüplere aktarılmaktadır. Bu tüpler içerisindeki sulandırılmış spermalar, sıvı azot içerisine daldırılarak sıvı azot buharında -140°C de 5 dakika veya -196°C de 20-30 saniye hızlı bir şekilde dondurma işlemi yapılmaktadır (Şen, 2013; Shahba ve ark., 2016). Bu dondurma yönteminde dondurma işleminin hızlı yapılmasına bağlı olarak hücreler arası buz kristallerinin hacminin büyük olması daha başarılı liyofilizasyon işleminin gerçekleşmesini sağlamak amacıyla yapılmaktadır (Nireesha ve ark., 2013; Baştan ve Akçay, 2019).

Spermatozoonun liyofilizasyon işlemi, dondurma, esas kurutma ve son kurutma olarak 3 aşamada gerçekleştirilmektedir.

Spermatozoonun dondurma işlemi liyofilizasyon cihazında yapılabildiği gibi sıvı azot içerisinde veya sıvı azotun buharında da yapılabilmektedir (Ergün, 2015).

-30°C ile -80°C arasında önceden soğutulmuş liyofilizasyon cihazı içerisine, dondurulma işlemi tamamlanmış spermaları yerleştirilerek esas kurutma aşamasına geçilmektedir. Bu süreçte kademeli olarak sıcaklığı 37°C'ye getirirken, basıncı 0,03 mbar seviyesine çekerek dondurulmuş spermadaki suyun yaklaşık %90'ını süblimasyon etkisiyle uzaklaştırılmaktadır. Bu uzaklaştırılan su, serbest halde bulunan suyun tamamını ve bağlı suyun bir kısmını içermektedir. Geriye kalan yapısal bütünlüğü sağlayan su ise daha düşük atmosferik basınç ile yüksek sıcaklık uygulanarak uzaklaştırılmaktadır (Sherman 1954; Gil ve ark., 2014). (Şekil 9).



Şekil 9. Liyofilize spermatozoon (Choi ve ark., 2011)
Figure 9. Lyophilized spermatozoa

Liyofilize spermatozoonlar, nemli ortamlardan uzak, vakumlu tüpler içerisinde ışıktan korunarak muhafaza edilmelidir. Sıvı azottan bağımsız bir şekilde farklı

sıcaklıklarda (+25°C, +4°C, -20°C, -80°C) saklama imkanı sağlayan bu yöntem, ıslah ve genetik çalışmalarda birçok araştırmacı tarafından kullanılması öngörülmektedir (Kaneko, 2016).

Sonuç

Islah ve genetik çalışma için dondurulmuş materyallerin sıvı azot içerisinde saklanması günümüz şartlarında zorunludur. Ancak sıvı azotun ortam ısısına bağlı bir şekilde buharlaşarak azalması, sürekli sıvı azot takviyesi yapılmasını gerektirmektedir. Ayrıca zamanında yapılamayan sıvı azot takviyesi, mevcut genetik materyalin geri dönüşümsüz olarak kullanılamaz hale gelmesine yol açabilmektedir. Günümüzde kullanılan yöntemler baz alındığında hemen hemen hepsinin dondurulma aşamasında ya da sonrasında sıvı azota ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalar ışığında aynı zamanda görülmüştür ki güncel yöntemler de dahil hala genetik materyalin hasar görmeden saklanması için %100 bir prosedür geliştirilememiştir. Bu çalışma konunun önemini bir kez daha vurgulamak amacıyla hazırlanmıştır.

Kaynaklar

- Ak, K. (2000). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İ Ü Vet Fak Yayını. Ders Notu No:112.İstanbul.pp; 69, 76, 102, 196-197.
- Arav, A. (1999). Device and Methods for Multigradient Directional Coolingand Warming of Biological Samples. Interface Multigrad Technology,United States.
- Arav, A., & Saragusty, J. (2016). Directional freezing of sperm and associated derived technologies. Animal reproduction science, 169, 6-13.
- Baştan, İ., & Akçay, E. (2019). Spermatozoon liyofilizasyonu: Hayvan genetik kaynaklarının korunması için yeni bir saklama modeli olabilir mi?. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 59(Ek Sayı), 130-136.
- Billi, D., & Potts, M. (2002). Life and death of dried prokaryotes. Research in microbiology, 153(1), 7-12.
- Blackshaw, B. A. (1955). Factors affecting the revival of bull and ram spermatozoa after freezing to—79° C. Australian Veterinary Journal, 31(9), 238-241.
- Bucak, M. N., & Tekin, N. (2007). Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 54(1), 67-72.
- Choi, Y. H., Varner, D. D., Love, C. C., Hartman, D. L., & Hinrichs, K. (2011). Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. Reproduction, 142(4), 529.
- Colenbrander, B., Feitsma, H., & Grooten, H. J. (1993). Optimizing semen production for artificial insemination in swine. Journal of reproduction and fertility-supplement-, 207-207.
- Crowe, J. H., & Crowe, L. M. (1984). Effects of dehydration on membranes and membrane stabilization at low water activities. Biological membranes, 5, 57-103.
- Cupps, P. T. (Ed.). (1991). Reproduction in domestic animals. Elsevier.

- Çoyan, K., Ataman, M. B., Kaya, A., & Karaca, F. (2002). Evcil hayvanlarda dölerme ve sun'i tohumlama. Selçuk Üni, Vet Fak Yayın Ünitesi.
- Çoyan, K. (2005). İneklere Suni Tohumlama El Kitabı, 73-75.
- Demirci, E. (2002). Evcil hayvanlarda reproduksiyon, suni tohumlama ve androloji ders notları. FÜ Vet Fak Ders Teksiri, (53).
- Ergün, Z. (2015). Biyolojik maddelerin kurutulması: liyofilizasyon. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 26(1), 35-40.
- Evans, G., & Maxwell, W. C. (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats (No. Ed. 2). Butterworths.
- Faustini, M., Bucco, M., Galeati, G., Spinaci, M., Villani, S., Chlapanidas, T., ... & Torre, M. L. (2010). Boar sperm encapsulation reduces in vitro polyspermy. Reproduction in domestic animals, 45(2), 359-362.
- Gacitua, H., & Arav, A. (2005). Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. Theriogenology, 63(3), 931-938.
- Gadella, B. M., & Luna, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. Theriogenology, 81(1), 74-84.
- Gil, L., Olaciregui, M., Luño, V., Malo, C., González, N., & Martínez, F. (2014). Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm. Reproduction in Domestic Animals, 49, 72-81.
- Gunn, R. M. C. (1934). Artificial production of ejaculation and the character of the sperm of the resultant ejaculate. Vet Rec, 14, 1379.
- Hill, H. J., Scott, F. S., Homan, N., & Gassner, F. X. (1956). Electroejaculation in the bull. J Am Vet Med Assoc. 128: 375-80.
- İleri, İ. K., Ak, K., Pabuçuoğlu, S., & Birlir, S. (2000). Reproduksiyon ve sun'i Tohumlama. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Yayını. Ders Notu No: 23.
- Kalkan, O., & Uçar, Ö. (2022). Semen Collection, Cryopreservation and Artificial Insemination in Dogs. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7(1), 61-69.
- Kaneko, T. (2016). Sperm freeze-drying and micro-insemination for biobanking and maintenance of genetic diversity in mammals. Reproduction, Fertility and Development, 28(8), 1079-1087.
- Koçyiğit, A., & Uslu, B. A. (2016). Kangal Irkı Köpeklerin Spermalarının Kriyoprezervasyonunda Sığır Serum Albüminin Etkisi. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 1(2), 47-52.
- Kutzler, M. A. (2005). Semen collection in the dog. Theriogenology, 64(3), 747-754.
- Love, C. C. (1992). Semen collection techniques. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 8(1), 111-128.
- Mathevon, M., Buhr, M. M., & Dekkers, J. C. M. (1998). Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. Journal of dairy science, 81(12), 3321-3330.
- Maxwell, W. M., & Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. Reproduction, Fertility and Development, 5(6), 613-638.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. American journal of physiology-cell physiology, 247(3), C125-C142.
- Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N. N. B. M., & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/freeze drying-an review. International journal of novel trends in pharmaceutical sciences, 3(4), 87-98.
- Okere, C., & Nelson, L. (2002). Novel reproductive techniques in swine production-a review. Asian-australasian journal of animal sciences, 15(3), 445-452.
- Özkoca, A. (1984). Çiftlik hayvanlarında reproduksiyon ve suni tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, (4), 79-89.
- Palmer, C. W., Brito, L. F. C., Arteaga, A. A., Söderquist, L., Persson, Y., & Barth, A. D. (2005). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. Animal reproduction science, 87(1-2), 25-31.
- Perteghella, S., Vigani, B., Crivelli, B., Spinaci, M., Galeati, G., Bucci, D., ... & Chlapanidas, T. (2015). Sperm encapsulation from 1985 to date: technology evolution and new challenges in swine reproduction. Reproduction in Domestic Animals, 50, 98-102.
- Pesch, S., & Hoffmann, B. (2007). Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology, 4(2), 101-105.
- Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S., & Lansac, J. (1996). Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. Human Reproduction Update, 2(6), 553-559.
- Rubinsky, B., & Ikeda, M. (1985). A cryomicroscope using directional solidification for the controlled freezing of biological material. Cryobiology, 22(1), 55-68.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. Animal reproduction science, 62(1-3), 77-111.
- Schroeder, A. C., Champlin, A. K., Mobraaten, L. E., & Eppig, J. J. (1990). Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. Reproduction, 89(1), 43-50.
- Shahba, M. I., El-Sheshtawy, R. I., El-Azab, A. S. I., Abdel-Ghaffar, A. E., Ziada, M. S., & Zaky, A. A. (2016). The effect of freeze-drying media and storage temperature on ultrastructure and DNA of freeze-dried buffalo bull spermatozoa. Asian Pacific Journal of Reproduction, 5(6), 524-535.
- Sherman, J. K. (1954). Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. The University of Iowa.
- Sönmez, M. (2012). Reproduksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ, Turkey.
- Spallanzani, L. (1776). Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell'uomo e degli animali. Opusculi di Fisica Animale e Vegetabile, Modena.
- Şen, U. (2013). Liyofilize spermanın in vitro embriyo üretiminde kullanımı. 8.Ulusal Zootehni Bilim Kongresi, 5-7 Eylül, Bildiri Kitabı, s:183-188.
- Uçan, U. (2014). Fruktoz, trehaloz ve sükröz içeren tris bazlı sulandırıcıya kolesterol yüklü siklodekstrin (CLC)

ilavesinin koç spermasının dondurulabilirlik ve çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkilerinin araştırılması (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Visser, D. (1974). The effect of pellet volume, dilution rates prefreezing and at thawing, and of thawing temperature on the survival and acrosome-morphology of frozen ram spermatozoa. *South African Journal of Animal Science*, 4(2), 147-155.

Wetzels, A. M. M., Bras, M., Lens, J. W., Piederiet, M. H., Rijnders, P. M., & Zeilmaker, G. H. (1996). Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/Theory*, 229, 244.

Yurdaydın, N. (1994). Spermanın alınması, saklanması ve Sun'i Tohumlama. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni tohumlama, Doğum ve İnfertilite*. Ed: E. Alaçam, 1.