

Dondurmanın (Kriyopreservasyon) Sperma Kalitesi ve Fertilite Üzerine Etkileri

Nurdan Coşkun, Fikret Karaca

MKÜ Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim dalı Hatay

Geliş Tarihi / Received: 09.09.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 25.03.2016

Özet: Dondurma protokolleri sıcaklık değişimi, kriyoprotektanların molar konsantrasyonuna maruz kalınmasıyla ortaya çıkan toksik ve osmotik stres, hücre dışı ortamda buz oluşumu ve çözülmesi gibi çok sayıda zararlı olabilecek stres faktörlerine sahiptir. Ayrıca, kriyopreservasyonun çeşitli sperm organellerini de etkilediği bilinmektedir. Erken akrozomal reaksiyonun başlatılması, mitokondrial fonksiyon değişikliği, motilitenin azalması, kromatin dekondezyasyon kusuru, kromatin yapısının değişikliği ve DNA değişikliğini başlatması, bunların tamamı spermatozoonların fertilitelerini ve canlı kalma sürelerini etkilemektedir. Sulandırıcılara katılan kriyoprotektan maddeler spermatozoonlarda bazı korumalar sağlamakta ve kriyopreservasyonun yan etkilerini minimize etmektedirler. Kriyopreservasyonun başarısı hayvanların bireysel farklılığının yanı sıra kriyoprotektanlar arasındaki etkileşimleri, sulandırıcı tipi, soğutma hızı, çözdürme hızı ve dondurma tekniklerini de içine alan birçok faktöre bağlıdır. Dondurulmuş çözdü-rülmüş spermanın fertilitesi taze spermadan daha düşük olduğu için çözdürme sonrası spermatozoon kalitesinin doğru değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Bu derlemede, dondurmanın sperma kalitesi ve fertilitte üzerine etkilerinin genel bir değerlendirilmesi yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Spermanın dondurulması, fertilitte, sperm kalitesi

Effects of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility

Abstract: The cryopreservation protocols have a number of potentially damaging stresses such as the change in temperature, the osmotic and toxic stresses presented by exposure to molar concentrations of cryoprotectants and the formation and dissolution of ice in the extracellular environment. Various sperm organnels have been known to be affected due to the detrimental effects of cryopreservation. Induction of premature acrosomal reaction, altered mitochondrial function, reduction of motility, failure of chromatin decondensation, change chromatin structure and originate DNA alterations all of which influence the viability and fertility of the sperm cells. Addition of cryoprotectant agents in extenders have been used in an attempt to providing some protection to spermatozoa and minimizing the adverse effects of cryopreservation. The success of cryopreservation depend upon many factors, including interactions among cryoprotectants, type of extender, cooling rate, thawing rate and freezing techniques as well as variation among individual animals. Because fertility of frozen thawed semen is poorer than fresh semen, proper evaluation of the post thaw quality of spermatozoa is very significant. In this review, it was made a general evaluation with the effects on semen quality and fertility of the cryopreservation.

Key words: Semen cryopreservation, fertility, sperm quality

Giriş

Hayvancılık sektöründe vazgeilmez öneme sahip olan reproduksiyon biyoteknolojisi; suni tohumlama, in vitro fertilizasyon, gen transferi ve klonlama gibi birtakım yenilikleri kapsamaktadır. Bu teknikler arasında en etkin ve yaygın olanı, erkek gamet hücrelerinin dondurulması ve dişi hayvanların suni yolla tohumlanması esasına dayanan suni tohumlama tekniğidir [38]. Gliserolün kriyoprotektif etkisinin keşfedilmesiyle spermanın dondurulması alanında önemli gelişmeler kaydedilmiş ve 1950'li yılların başında sınırlı olan sun'i tohumlama uygulamaları yaygınlaşmıştır [15]. Günümüzde birçok

türün sperması dondurulmakta, -196 °C'de sıvı azot içinde uzun süre saklanabilmekte ve çözdürme sonrası tatmin edici oranda fertilitte sonuçları alınabilmektedir [21]. Ancak, güncel tekniklerin çoğunda dondurma işleminin spermatozoonun fonksiyonu ve fertilitte için olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir [28,53].

Sperma Dondurmada Kullanılan Sulandırıcılar

Sperma hayvan türlerine göre değişen teknik ve yöntemlerle dondurulabilmektedir. Ancak dondurma işlemlerinin prensipleri ortaktır. Bu prensiplerin başında spermanın uygun medyumlarda sulandırıl-

ması gelmektedir. Yumurta sarısı hemen hemen tüm türlerde kısa ve uzun süreli saklamada kullanılmaktadır. Sulandırıcılarda kullanılan diğér bir madde yağlı, yağsız ve işlenmiş süttür. Yumurta sarısı ve süt hayvansal orjinli olduklarından kontaminasyon riskleri vardır [25]. Ayrıca, farklı hayvan türlerinin spermaları ile sulandırıcılar arasındaki ilişkilerin bilinmesi önemlidir. Teke spermasının saklanmasıdaki en önemli problem, spermatozoonların canlılığı üzerine seminal plazmanın yumurta sarısı ve süt bazlı sulandırıcılarla zararlı tepkimeler göstermesidir. Yumurta sarısı içeren sulandırıcılarda bu problem bulboüretal bez sekresyonunda bulunan ve seminal plazmada yer alan yumurta sarısı koagüle edici enzime (YSKE) bağlanmıştır. YSKE yumurta sarısı lesitinini yağ asitlerine ve lisolesitine dönüştüren bir enzimdir. Lisolesitin ise spermatozoonlar üzerine öldürücü etki göstermektedir. Keçi spermasındaki bir diğér faktör ise seminal plazmada bulunan SBUIII olarak isimlendirilen ve süt temelli sulandırıcı bileşenleri ile etkileşime girerek sütteki trigliseridleri hidrolize ederek spermatozoonlar üzerine toksik etkili olan oleik asidi ortaya çıkaran bir protein fraksiyonunun spermatozoon canlılığını baskılamasından sorumlu olduğu saptanmıştır [45].

Sulandırıcılardaki glukoz ya da fruktoz spermatozoonun enerji kaynağını oluştururlar. Sulandırıcılarda ozmotik basınç ve hidrojen iyon konsantrasyonunu ayarlamak için sitrat, tris, fosfat ve sitrik asit gibi tampon maddeler yaygın olarak kullanılmaktadır. Spermadaki bakteri miktarının artması spermatozoonlar için zararlıdır. Bunu önlemek amacıyla, sulandırıcılarda hayvansal orijine dayanmayan apatojen steril ürünler veya SPF (specific pathogen free) yumurta sarısının kullanılmasının daha güvenli olduğu savunulmaktadır [48].

Donma çözme sonu spermatozoa canlılığını artırmak, oksidatif hasar ve osmotik zararı azaltmak temel amaç olmuştur. Örneğin; araştırmacılar sulandırıcılara antioksidan ekleyerek lipid peroksidasyonun sebep olduğu oksidatif stresi azaltmaya çalışmışlardır. Gliserol ve yumurta sarısı sulandırıcıları spermayı dondurmak için kullanılan ilk sulandırıcılar arasındadır ve bugün ana kriyoprotektan olarak gliserolü içeren birçok sulandırıcı kullanılır [9]. Sulandırıcıya katılan düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) kullanımı ile DNA bütünlüğünün korunmasının mümkün olduğu kaydedilmektedir [46].

Spermanın Dondurulması (Kriyopreservasyon) ve Dondurmanın Mekanizması

Dondurma işleminde amaç; canlı bir hücre veya dokunun çok düşük sıcaklıklarda minimum hasarla fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır [4]. Spermatozoonları dondurmanın zararlı etkilerinden korumak için kriyoprotektan maddeler kullanılmaktadır. Kriyoprotektanlar genel olarak koruyucu etkilerini, ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve iyon miktarını azaltarak gösterirler [39]. Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulması esnasında oluşan soğuk şoku zararına, intrasellüler kristal oluşumuna, çözüm esnasında dekrizalizasyona ve gelişen membransel destabilizasyona karşı koruyuculuk sağlarlar [6]. Ancak, hem penetre (hücre içine girebilen) hem de penetre olmayan (hücre içerisine giremeyen) kriyoprotektanların spermatozoonlarda bazı zararlara sebep oldukları tespit edilmiştir. Bu zararların osmotik basınç değişikliklerinin bir sonucu olarak fiziksel hasarlardan ya da subsellüler bileşiklerin biyokimyasal bozukluklarından kaynaklandığı kaydedilmektedir [43,55].

Hücrelerin dondurulmasında suyun biyolojik formunun değişimi söz konusu olup, olay suyun kristalleşmesi ve şekil değiştirmesi ile gerçekleşir. Hücrelerin dondurulma işlemi sırasında ekstraselüller solüsyon kendiliğinden veya etkime (seeding) yöntemi ile -5 °C ila -10 °C'de kristalleşir. Ekstrasellüler ortam kristalleşirken intrasellüler ortam hücre membranının etkisiyle henüz donmamıştır. Söz konusu oluşum sırasında ekstraselüller suyun buzlaşması nedeniyle ortamda bulunan maddelerin yoğunluğunda artış olur. Bu durum kimi kimyasal maddelerin hücre içinde ve dışında farklı yoğunlukta bulunmalarına yol açar. Meydana gelen farklı yapı ya da denge nedeniyle bir kısım sıvının hücre dışına çıkması ile bu kez de hücre içerisinde bulunan erimiş maddelerin yoğunluğunda yükselme ve hücre içi kristalleşme şekillenir. Bu süreçler hücrelerin dondurulmasında olduğu gibi çözdürülmesinde de soğutma hızının etkisine bağlı olarak az ya da çok ters yönde meydana gelir. Hücrenin membran bütünlüğü ve normal yapısı, hücrenin metabolik fonksiyonları için mutlak gereklidir. Normal vücut ısısında hücre membranı lamelli, iki sıralı fosfolipit ve protein dizilerinden oluşur. Ortamdaki ısı değişimleri söz konusu membran yapısını direkt etki-

lemesiyle metabolik olaylarda azalma ve hücre içi iyon ve molekül kayıplarına yol açmaktadır [6].

Dondurmanın Spermatozoonlar Üzerine Etkileri ve Dondurma Hasarları

Spermatozoonlar fertilizasyon kabiliyetini kazanıncaya kadar, somatik hücrelerden değişir ve gelişirler. Bir spermatozoon temel olarak sıkıştırılmış çekirdek metaryalini içeren bir baş, güç kaynağı olarak görev yapan orta kısım ve itici bölge olarak görev yapan kuyruk olmak üzere 3 fonksiyonel bölgeden oluşmaktadır. Spermatozoonlar epididimiste olgunlaşır, seminal plasma ve dişi genital kanal sekresyonları ile uyarılırlar [50]. Spermatozoonların son şeklini oosit ve zona pellusida verir. Spermatozoonlar tüm bu süreçleri geçirmesinin sonucu olarak, çevresel etkilere daha duyarlı olmakta ve kendini yenileme kabiliyetinde azalma gibi istenmeyen özelliklere de sahip olmaktadır. Bu nedenle ideal koşullar altında bile dondurma sürecinde spermatozoonlarda kaçınılmaz bazı zararlar meydana gelmektedir [3]. Spermanın sıvı azot buharında dondurulmasında spermatozoonun soğuk şokundan olumsuz etkilenmeleri nedeniyle spermatolojik özelliklere ait değerler değişebilmektedir. Hücre membranlarında oluşan perforasyonların, özellikle akrozomda bulunan ve fertilizasyonda görev alan enzimlerin kaybına yol açtığı ve bu spermatozoonun dölleme yapamadığı kabul edilmektedir [51]. Spermatozoonların dondurulması esnasında meydana gelen hasarlar arasında soğuk şoku, kristal oluşumu, osmotik stres ve osmotik şişme yer almaktadır.

Spermatozoonlar için soğutma işlemi sırasında 0 °C ile -5 °C ve buz kristallerinin oluştuğu -6 °C ile -15 °C arasındaki sıcaklık aralıkları kritiktir [52]. Spermatozoonların soğuk şokuna maruz kalması sonucu gelişen zararlar, intrasellüler dehidrasyon, membran lipid ve proteinlerinde destabilizasyon ve denatürasyon, hücre ve endoplazmik retikülümünde osmotik şişme, plazma membranında intramembranöz kümeleşme ve akrozomal enzimlerin salınımı olarak sıralanabilir [10]. Ayrıca soğuk şokuna uğrayan spermatozoonlarda sirküler hareketin artması, motilite kaybı, spermatozoon oosit füzyon kapasitesinde azalma, serbest oksijen radikallerinin artışı ve fertilitéde azalma meydana gelmektedir. Boğa, koç, domuz ve aygır spermatozoonunun ani ısı düşmesiyle oluşan soğuk şokuna karşı köpek, kedi ve tavşan

spermatozoonuna göre daha fazla duyarlılık gösterdikleri kaydedilmektedir [6].

Sıcaklığın donma derecelerinin altına düşmesini takiben hücre içi ve dışı buz kristalleri oluşur. Sıvılardaki kristalleşmeyi takiben, donmamış fraksiyondaki fiziksel özellikler değişmekte, kristalleşmenin doğurduğu gaz, ortam viskozitesini arttırmakta ve pH'da önemli değişimlere neden olmaktadır. Kristalleşmenin yarattığı stres faktörü, hücrede ozmotik büzümeye ve membran lipid fazında değişimlere yol açmaktadır [54].

Ozmotik stres, intra/ekstrasellüler ortamdaki osmotik farktan kaynaklanmaktadır [10]. Kriyoprotektanların ilavesi ortamın hiperozmotik olmasına ve hücre membranından içeriye geçmesiyle hücrede dehidrasyonun şekillenmesine neden olmaktadır. Kriyoprotektanların uzaklaştırılmasında hücreler tekrar şişmekte ve isoozmotik hacme ulaşmaktadır. Bu tekrarlanan değişimler kritik noktaları geçtiğinde, hiperozmotikliğe bağlı irreversible membran yıkımları olmaktadır. Ayrıca hücredeki küçük porların varlığı potasyum ve sodyum iyonlarının giriş çıkışını sağlayarak, hücrenin hipoozmotik stres ve koloidal osmotik hemolize duyarlılığını artırmaktadır [6].

Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde, hücre zarının dondurma işleminden ilk etkilenen bölge olduğu doğrulanmıştır. Bu yöntemle hücre zarında tespit edilen yapısal değişiklikler; protrüzyonlar, dalgalanmalar ve vezikülasyonlardan; membran kayıpları, yırtılmaları ve erimeleri gibi membran bütünlüğünün bozulduğu ağır harabiyetlere kadar vardığı gözlenmiştir [36].

Dondurmanın Spermatozoon Metabolizması Üzerine Etkileri

Birçok aktif vücut hücreleri gibi spermatozoonlar da sitrik asit döngüsü, oksidatif fosforilizasyon ve glikolizis için gerekli olan metabolik mekanizmaya sahiptir. Spermatozoon için ATP başlıca ya sitoplazma içinde glikolizis yolu ile ya da mitokondrideki oksidatif fosforilizasyon vasıtasıyla elde edilir [13]. Genel olarak kriyopreservasyon esnasında ATP nin intrasellüler konsantrasyonu azalır veya kaybolur ve AMP/ADP oranı artar [47,13].

Ejaküle edilen spermatozoonların fertilité potansiyelinin değerlendirilmesinde sıkça kullanılan

spermatozoal motilitenin, mitokondrial fonksiyona bağımlı olduğu bilinmektedir. İç mitokondrial membran içinde oksidatif fosforilasyon yolu ile üretilen ATP, motiliteyi sürdürmek için mikrotubullere transfer edilir. Bu yüzden kriyopreservasyonda spermatozoon motilitesindeki azalmanın özellikle mitokondrial hasar ile ilgili olduğu düşünülmektedir [47].

Spermatozoanın kriyopreservasyonu hem oksidatif strese hem de fiziksel strese neden olmaktadır [33]. Oksidatif stres, normal spermatozoon fonksiyonlarını etkilemekte ve spermatozoonların yüksek oksijen basıncı altındaki inkübasyonu, spermatozoon motilitesinde hızlı bir düşüşe neden olmaktadır. Özellikle aygır spermasında aşırı oksidatif strese bağlı yan etkiler bariz şekilde görülmektedir. Bu duyarlılık; antioksidanların sentezlenme kabiliyetinin eksikliğinden, çoklu doymamış yağ asitleri içeriğinden ve spermatogenezin sonlarına doğru sitoplazmalarının büyük kısmını kaybetmelerinden ileri geldiği kaydedilmektedir [1].

Taze sperma ile karşılaştırıldığında dondurulmuş spermanın yaşam süresi kısa ve fertilitesi düşüktür. Bu durum taze ve dondurulmuş spermadaki O_2^- ve H_2O_2 'nin üretim oranına veya intraselüler serbest kalsiyum iyonlarının yoğunluğundaki büyük farklılığa bağlanmaktadır [44]. Spermatozoon proteinlerindeki tiyol (merkaptan)lerin O_2^- ve H_2O_2 tarafından oksidasyonunun spermatozoon motilitesi ve fertilizasyon yeteneğinin engellenmesi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [31].

Kriyopreservasyonun Spermatozoal Yapılar Üzerine Etkileri

Memeli spermatozoonları vücut dışına çıktıktan sonra plazma membranlarının hassasiyetinden dolayı düşük ısılarla oldukça duyarlıdırlar. Donma membran değişikliklerini başlatmakta, çözdürme ise membran protein aktivitesi ve permeabilite değişikliklerine bağlı olarak, su ve iyonların hücre içi ile hücre dışındaki farklılıkları, canlı spermatozoonlarda kayıplara sebep olmaktadır [5]. Membranın kolesterol/fosfolipid oranı, lipid içeriği, hidrokarbon zincir doygunluğunun derecesi ve protein/fosfolipid oranı spermatozoon hassasiyetini belirleyici özelliklerdendir [34]. Her hayvan türünün farklı bir membran kompozisyonuna sahip olmaları, sıcaklık değişimlerine karşı farklı tepkiler vermelerine se-

bep olmaktadır. Membranlar doğal olarak akışkandır ve bu etkili fonksiyonlarının bir ön koşuludur. Membran yapısındaki fosfolipid ve kolesterolün yoğunlukları, akışkanlığı etkileyen iki ana faktör olup, bunların oranı membran esnekliğini belirlemektedir. Fosfolipidleri fazla olan türlerde esnek membran yapısı daha sık gözlenir. Membranlar soğutulduğunda, lipidler normal akışkan durumlarından likid kristal durumuna geçişe maruz kalırlar ve yağ asidi zincirleri bozulur [34]. Dondurma esnasında bu likid kristal durumu jel durumuna dönüşür, bu sırada burada yağ asidi zincirleri katı bir yapı oluşturarak yeniden düzenlenirler [6]. Bu değişiklikler membran içi enzimlerinin kinetiğinde değişime yol açarak çözüm sonu spermatozoon canlılığını azaltmaktadır. Faz geçiş sıcaklık dereceleri lipid yapısına göre değişkenlik göstermektedir. Genel olarak; daha uzun yağ asit zincirlerinin faz geçiş sıcaklığı daha yüksektir [40]. Spermatozoonun plazma membranındaki ana fosfolipidler; fosfatidil kolin, sfingomiyelin ve fosfatidil etanolamin olarak isimlendirilirler, bu fosfolipidlerin çift katmanlı membran içerisindeki pozisyonları farklıdır. Fosfatidil kolin ve sfingomiyelin dış katmanın ile ilişkilidir halbuki fosfatidil etanolaminin iç katmana affinitesi vardır. Membranın stres altında olmadığı durumlarda, bu affiniteler belirgin değildir. Soğuk şoku fosfolipidlerin çift katmanı boyunca dağılımlarını değiştirmelerine sonuçta membran fonksiyon değişikliğine sebep olmaktadır [21].

Spermatozoon membranının başka bir önemli bileşeni proteinlerdir. Protein-lipit etkileşimleri membranın fonksiyonel etkinliği için kritiktir. Protein-lipid etkileşimleri bozulursa jelleşme meydana gelir ve proteinler enzim, reseptör ya da kalsiyum gibi iyonlar için iyonik kanallar olarak etkili şekilde fonksiyon yapamazlar [34]. Membran konfigürasyonundaki bozukluklardan, spermatozoonu sararak dışı genital kanalda şeklini sabitleyen, kayganlık sağlayan ve yapısında bolca şeker içeren glikokaliks denen periferel proteinler de etkilenmektedirler. Bu periferel proteinler membran sıvı durumdan jel durumuna dönmeye başlarken, hala sıvı durumunu koruyan bölgelere kümeleşme ve yapışma yaparlar. Membran lipid konfigürasyonları için bu değişikliklerin çoğunun irreverzibl olduğu, spermatozoonun ısı yükseldiğinde orijinal membran konfigürasyonunu tekrardan oluşturulmadığı bildirilmektedir [3].

Dondurma işlemi, hücre membranı boyunca proteinlerin transferiyle ilişkili mekanizmayı etkilemekte ve akrozom membranında akrozomal enzim proteinlerinin zarar görmesine neden olmaktadır [20]. Bu bozulma plazma membranında glukoz taşıyan proteinlerde de (GLUT) görülür. GLUT proteinleri, memeli sperm membranından heksoz monofosfat geçişinin ana sorumlusudur [24]. GLUT gibi glukoz taşıyıcı proteinlerin plazma membranındaki yanlış konumlanmalarının, kriyopreservasyonla ilgili esas problem olduğu bildirilmektedir. GLUT proteinler köpek, domuz ve insan spermatozoon membranında tespit edilmiştir. Bunların spermatozoon glukoz ve fruktoz metabolizmasını düzenlemekte önemli rollerinin olduğu belirtilmektedir [35].

Moleküler çalışmalar, kriyopreservasyonun spermatozoal mitokondria değişikliği gibi çeşitli spermatozoon organellerinde zararlı etkilerinin olduğunu göstermektedir [37]. Özellikle aygır spermatozoonlarının mikroskopik muayenesinde soğuk şokundan mitokondrial krista fonksiyonunun da etkilendiği belirlenmiştir. Mitokondrial yapıdaki bu zarar dondurma sonrası motilite azalmasının nedeni olarak düşünülmektedir [47].

Kriyopreservasyon sırasında spermatozoonun kromatin yapısı ile birlikte DNA'sının da değiştiği ve zarar gördüğü kaydedilmektedir [17]. Dondurma ve çözündürmenin insan, domuz ve koç spermatozoonlarında anormal kromatin yoğunlaşmasını arttırabileceği ifade edilmektedir [50].

Kriyopreservasyonun Kapasitasyon Benzeri Etkisi

Hücre içi kalsiyum seviyesi spermatozoonun kapasitasyonu, hiperaktivasyonu ve akrozom reaksiyonu esnasında yükselir. Artan kalsiyum iyon konsantrasyonunun kapasitasyonla ilişkili bir intraselüler sinyal yolunu tetiklediği düşünülmektedir. Kapasitasyon ve kriyopreservasyon spermatozoonlar içine kalsiyum girişini de içeren birçok benzer değişiklikleri uyarmaktadır [5]. Ancak spermatozoonlar, kriyopreservasyon esnasında normal internal kalsiyum seviyesini ayarlamada başarısız olurlar. Kriyopreservasyon esnasında membranların yeniden yapılandırılması ve çarpık lipid-protein ilişkileri, daha fazla kalsiyum iyonunun içeriye akışına neden olduğu düşünülmektedir. Anormal kalsiyum iyon

konsantrasyonundan dolayı normal kapasitasyonun ve akrozom reaksiyonun bozulması, spermatozoonun çözülme sonrası potansiyel fertilitatesini önemli derecede riske etmektedir. Diğer yandan çözündürme sonrası kriyopreservasyon kaynaklı membran değişikliklerinden dolayı kısmi bir kapasitasyon durumu oluşmaktadır. Dondurarak saklanan spermatozoonlar dişi genital kanalında daha kısa ömürlü ve fertilizasyon kabiliyetleri önemli oranda etkilenmiş spermatozoon özelliği gösterirler [51]. Kapasite olamayan spermatozoonlarda meydana gelen değişiklikler klortetrasiklin florasan B tekniği ile boğada [8], domuzda [32], aygırda [49] ve mandada [22] belirlenmiştir. Ayrıca dondurma ve çözündürme sonucu hücre içi kalsiyum artışları membran hasarıyla ilişkilendirilmektedir [5].

Çözdürme Sonrası Sperma Kalitesinin Değerlendirilmesi

Sperma kalitesi ve bunun fertilite ile ilişkisi hayvansal üretimde büyük öneme sahiptir. Bu nedenle in vitro testler spermatozoa kalitesini belirlemek için sık sık uygulanır [7]. Çözdürme sonrası çekirdek, akrozom, kuyruk, mitokondri ve plazma membranı spermatozoonun değerlendirmeye gerek duyulan en önemli bölgeleridir. Bu farklı bölümleri değerlendirmek için bir dizi laboratuvar testleri tasarlanmıştır. Böylece spermatozoal hasarın lokalizasyonu belirlenebilmekte ve daha sağlıklı bir değerlendirme yapılabilir [19]. Plazma membran bütünlüğünün değerlendirilmesinde bugün kullanılan laboratuvar prosedürleri oldukça çeşitlidir. Bunlar arasında eozin gibi non-permeabl özellikteki boyalar ile hipoozmotik şişme testi (HOST) yaygın kullanılan testlerdir [11]. Foote, erkek damızlığın fertilite yeteneğinin belirlenmesinde; rutin kullanılan spermatolojik testlerin yanı sıra, DNA kalitesi, enzimatik aktivite, ozmotik stres testleri, inkübasyon testleri, artırılmış akrozom reaksiyon oranı, mukus veya jel penetrasyon testi, hamster oosit penetrasyon testi ve heterospermik tohumlama testlerinin de uygulandığını bildirmektedir [16]. Fonksiyonel bölgelerin aktivitelerini belirlemek için floresan boyalarla, mitokondriyal ya da akrozomal boyalar kombine edilerek kullanılması daha sağlıklı fertilite tahmininin elde edilmesini sağlamaktadır [23]. Son zamanlarda CASA (Computer asisted semen analyzer) sistemi ejakülata kinetik özellikleri hak-

kında detaylı bilgi vermektedir. CASA ile motilité ve spermatozoanın karakteristik hareketleri in vivo fertilité ile ilişkilendirilmektedir [18].

Spermatozoonların fertilité yeteneğinin belirlenmesinde, spermatozoonlardaki DNA hasarlarının tespit edilmesi de önemlidir. Çünkü fertil ancak hasar görmüş bir spermatozoona bağlı erken embriyonik ölümler görülebilir. Son yıllarda biyokimyasal belirleyiciler kullanılarak spermatozoal fonksiyonların ve DNA hasarının belirlenmesine yönelik çalışmaların yoğunlaştığı görülmektedir [14].

Kromatin yapı tahlil testleri (SCSA) çeşitli türlerde geleneksel metotlar ile izlenemeyen spermatozoal kromatininin denatürasyonunu belirlemek için kullanılan flow sitometrik bir prosedürdür. Denatürasyona karşı kromatin duyarlılığı, mevcut DNA zincir kırıkları seviyesi ile ilişkilidir ve bu spermatozoonların genetik olarak kusurluluğunun bir göstergesi olarak düşünülmektedir [30]. DNA hasarlı bir spermatozoonun membran bütünlüğünde ya da motilitesinde farkedilir bir bozukluğun olmayabileceği fakat bu hasarın fertilizasyon sonrası embriyonik gelişimde başarısızlığa neden olabileceği kaydedilmektedir [42].

Dondurma ve Çözdürme Oranlarının Sperma Kalitesine Etkisi

Dondurmada kullanılan yöntemler çözüm sonucu sperma parametrelerine etki etmektedir. Bilgisayar destekli dondurma cihazlarında dondurulan spermatozoonların geleneksel olarak azot buharında dondurulan spermatozoonlardan birçok in vitro özellik bakımından daha iyi oldukları belirlenmiştir. Dondurma esnasında sadece düşülen sıcaklık değil düşme hızı da önemlidir [3]. Dondurma işlemi sırasında spermatozoonların zarar görmemesi için sıcaklık yavaş yavaş düşürülmelidir. Çünkü sıcaklık yavaş düşürüldüğü takdirde su daha uzun süre osmotik basınca maruz kalacağından, hücre içerisinde bulunan su daha fazla dışarı çıkabilmekte, hücre içerisinde çözünen maddelerin konsantrasyonu artmakta, hücre içi ve hücre dışı su dengesi sağlanmaktadır. Sonuçta hücrede dehidrasyon şekillenmekte ve hücre içi donma görülmektedir. Ancak intraselüler dehidrasyon ve çözünen konsantrasyonunun artışı gibi istenmeyen durumlar olmaktadır. Ayrıca uzun süre yüksek osmolarite ile karşı karşıya kalan hücrede

membran lipoproteinlerinde denatürasyon ve sonucunda sitoliz oluşmaktadır [29].

Donma işlemi hızlı yapıldığında yeterli miktarda su hücre dışına çıkamaz. Bunun nedeni ise hücre dışı sıvıda konsantrasyonun hızlı şekilde artmasıdır. Hücre dışına çıkamayan su, hücre içerisinde buz kristallerinin oluşmasına neden olur ve büyük intraselüler buz kristalleri fiziksel zarara sebep olur [12].

Spermatozoonun hayatta kalması optimum soğutma oranına bağlıdır. Optimal soğutma oranı intraselüler çözünen maddelerin aşırı konsantrasyonlarını ve intraselüler dehidrasyonu azaltacaktır, böylece spermatozoonların aşırı büzülmesi azalır. Ancak, optimum soğutma oranlarında bile spermatozoonlarda hassasiyet olmaktadır [52].

Donmuş spermatozoanın çözündürme sürecinde ultra mikroskopik düzeyde buz kristallerinin rekristalizasyon süreci içinde gerçekleştiği ve büyük buz kristallerine göre oldukça küçük buz kristallerinin spermatozooya zarar verdiği bildirilmektedir [51]. Araştırmalarda ısınma hasarının özellikle -5 °C ile -15 °C arasında gerçekleştiği bildirilmiştir [26]. Hızlı çözündürme işlemi 75 °C'de 7 saniye rekristalizasyonun en az görüldüğü ve canlılığın en fazla saptandığı bildirilsede, saha şartlarında tavsiye edilen ısı ve süre 37 °C'de 30-45 saniyedir. Hızlı çözündürme esnasında rekristalizasyonun meydana gelmesi için zaman sınırlıdır ve bu spermatozoonların hayatta kalmalarını artırır. Ancak hücreden fazla kriyoprotektanların dışarı akışı için çözündürme süresi yetersiz olduğunda osmotik stres yaratır, spermatozoonlar şişer ve parçalanır [41].

Dondurmanın Spermatozoon Fertilitésine Etkileri

Dondurma işlemi, günümüzün en başarılı teknikleri kullanılsada spermatozoonlara zarar vermektedir. Bunun en temel nedeni dondurma öncesi ve sonrası spermatozoonun fiziksel olarak farklılığa uğramasıdır. Bu farklılıklar onu in vitro ve in vivo her türlü etkene karşı hassaslaştırır. Kriyopreservasyonun hücre metabolizması, çekirdek, hareket organelleri, sitoskeleton ve plazma membranı üzerine etkileri fertilitéyi de etkilemektedir [27]. Bu sebeple, spermatozoanın çözündürme sonrası kalitesinin uygun değerlendirilmesi, dondurulmuş spermanın fertilizasyon kapasitesi içinde son derece önemlidir. Fertilité ile sperma örneği içindeki motil spermatozoon

oranının arasında doğru bir orantı vardır. Fertilite özelliği olmayan akrozomu değişmiş bir spermatozoon, HOST ile tepkime vermemektedir [12]. İn vitro yapılan birçok test spermada motilite, morfoloji, akrozomal bütünlük, sperm organellerinin fonksiyonları, metabolizma işlevleri ve DNA bütünlüğü gibi değerlendirmeler fertilitiyle ilişkilendirilmektedir. Spermanın dondurulması işlemleri sırasında ısı değişimlerine ve oksijene maruz kalması lipid peroksidasyona ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine yol açmaktadır. Lipid peroksidasyon, hidroksil radikallerinin doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girmesiyle başlar ve oksijenle temas ettiklerinde lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar. Lipid peroksidasyon spermatozoada membran hasarına, respirasyonun inhibisyonuna ve intrasellüler enzimlerin dışarı çıkmasına, DNA hasarına ve dolayısıyla fertilitede önemli düşümlere sebep olmaktadır [2].

Sonuç

Hücreler kriyopreservasyon sırasında soğuk şokuna maruz kaldıklarında membransel ve ozmotik değişikliklere uğramaktadırlar. Bu değişiklikler ise hücrelerin çözüm sonu yaşamsal ve fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Dondurma hasarı nedeniyle çözündürme sonrası spermatozoon oosit füzyon kapasitesi azalabilir veya plazma membran lipid peroksidasyonuna bağlı olarak fertilizasyon olumsuz etkilenebilir. Kriyopreservasyon akrozom reaksiyonunda bozulmaya, mitokondriyal fonksiyon değişikliklerine, motilitenin azalmasına, kromatin yoğunluğunun bozulmasına, DNA hasarlarına neden olarak spermatozoonun canlı kalma süresini ve fertilitisini düşürmektedir. Kısacası dondurma işlemi günümüzün en başarılı teknikleri kullanılsa dahi sperma fonksiyonları üzerine zararlı etkiler sahiptir. Kriyobiyolojik mekanizmaların daha iyi anlaşılması, spermatozoonların dondurulmasındaki başarıyı artırarak fertilitiyi olumlu yönde etkileyeceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Aitken RJ, Baker MA (2004): Oxygene stres and male reproductive biology. *Reprod. Fert. Dev*, 16: 581-588.
- Amann RP (2005): Weaknesses in reports of fertility for horses and other species. *Theriogenology*, 63(3): 698-715.
- Andrabi SMH (2007): Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. Mini review. *Int. J. Agri. and Biol*, 9: 367-369.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N (2000): Semen cryopreservation in domestic animals Adaming and capacitation phenomenon. *J.Andri*, 21: 1-7.
- Bailey JL, Morrie A, Cormier N (2003): Semen cryopreservation success and persistent in farm species. *Can. J. Anim. Sci*, 83: 393-401.
- Bucak MN, Tekin N (2007): Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 54: 67-72.
- Clement F, Ladonnet Y, Magistrini M (2001): Sperm morpholgy and fertility. *Animal Reprod*, 68: 362-363.
- Cormier N, Sirard MN, Bailey JL (1997): Premature capatitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology*, 18: 461-467.
- Curry MR (2000): Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod*, 5: 46-52.
- Curry MR, Watson PF (1994): Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Criobiology*, 31: 39-46.
- Davies-Morel MCG (1999): Equine artificial insemination. Pp 416. CAB International, Wallingford, UK.
- Deneke N, Lemma A, Yılam T (2010): Study on the efficiency of convantional semen evaluation procedure employed at Kalti National artifical insemination center and fertility of frozen-thawed bull semen. As part of MSc thesis, Faculty of Veterinary Medicine Adidas Ababa University.
- Dziekonska A, Fraser L, Strzezek J (2009): Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18: 638-649.
- Evenson DP, Sailer BL, Jost LK (1995): Relationship between stallion sperm deoxyribonucleic acid (DNA) susceptibility to denaturation in situ and presence of DNA strand breaks: implications for fertility and embryo viability. *Biol. Reprod. Mono*, 6: 655-659.
- Fabrocini A, Del Sorbo C, Fasano G, Sansone G (2000): Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of Mediterranean buffalo (*B. Bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 193-207.
- Foote RH (2001): The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Sci*, Volume 80, Electronic Supplement 2. Per-revived papers from the ASAS National Meeting.
- Fraser L, Strzezek J (2004): The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid prezervation at 5 and 160 C. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 42: 49-55.
- Garner DL, Thomas CA, Gravance CG (1994): The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reproduction Domestic Animals*, 34: 399-404.
- Graham JK, Moce E (2005): Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64: 492-504.
- Guthrie HD, Welch GR (2005): Effects of hypothermic liquid storage and cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipid disorder and acrosome exocytosis in boar spermatozoa. *Reprod. Fertil and Dev*, 17: 467-477.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan J (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl*, 11: 73-88.
- Kardırcı G, Kumar S, Kumaresan A, Kathiravan P (2009): Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. *Anim. Reprod. Sci*, 116: 244-253.
- Kavak A, Johannisson A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Aïdnik M, Einarsson S (2003): Evaluation of cryopreserved stal-

- lion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.*, 76: 205-216.
24. Kokk K, Verajankorva E, Laato M, Wu XK, Tapfer H, Pollanen P (2005): Expression of insulin receptor substrates 1- 3, glucose transporters Glut 1-4, signal regulatory proteins 1 alpha, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B at the protein level in the human testis. *Anatomical Sci. Int.*, 80: 91-96.
 25. Kulaksız R, Daşkın A (2007): Teke spermasının kısa ve uzun süreli saklanması. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 78(4): 51-56.
 26. Kumar S, Millar JD, Watson PF (2003): The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram and boar semen a comparison of two controlled rate cooling machines. *Cryobiology*, 46: 246-53.
 27. Larsson B and Rodriguez Martinez H (2000): Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim. Reprod. Sci.*, 60: 327-336.
 28. Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey LJ, Sullivan R (2000): Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of Andrology*, 21: 700-707.
 29. Lovelock JE (1957): Denaturation of lipid protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proceedings of Royal Society of the London Series B*, (147): 427-433.
 30. Makhlof AA, Niederberger C (2006): DNA Integrity Tests in Clinical Practice: It is not a simple matter of black and White(or Red and Green). *J. Of Androl*, 27(3):316-23.
 31. Mammoto A, Masumoto N, Thara M, Ikebuchi Y, Ochmichi M, Tsaka K, Miyake A (1996): Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulphydryl protein in mice. *Biology of Reproduction*, 55: 1063-68.
 32. Maxwell WM, Johnson LA (1997): Chlorotetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*, 46: 408- 418.
 33. Mazur P, Katkova N, Critser JK (2000): The enhancement of the ability of Mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology*, 40: 187-209.
 34. Medeiros CMO, Farell F, Oliveria ATD and Rodrigues JL (2002): Current status of sperm cryopreservation; Why isn't better? *Theriogenol*, 57: 327-44.
 35. Medrano A, Garcia-Gil N, Ramio L, Rivera MM, Fernandeznovell JM, Ramirez A, Pena A, Briz MD, Pinart E, Concha II, Bonet S, Rigua T, Rodriguez-Gil JE (2006): Hexosespecificity of hexokinase and ADP-dependence of pyruvate kinase play important roles in the control of monosaccharide utilization in freshly diluted boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 1179-94.
 36. Morris GJ, Acton E, Avery S (1999): A novel approach to sperm cryopreservation. *Hum Reprod*, 14: 1013-21.
 37. Nishizono H, Shoda M, Takeo T, Irie T, Nakagata N (2004): Decrease of fertilizing ability of Mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biol. Reprod*, 71: 973-978.
 38. Nur Z, Ak K (2003): Donmuş spermanın saklanması ve eritilmesi. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med*, 22, 1-2-3: 97-102.
 39. Palasz AT, Mapletoft RJ (1996): Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv*, 14, 127-149.
 40. Parks JE, Graham JK (1992): Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 210-223.
 41. Pegg DE (2002): The history and principles of cryopreservation. *Semi. Reprod. Med*, 20: 5-13.
 42. Petrunkina AM, Waberski D, Gunzel-Apel AR, Topferpetersen E (2007): Focus on determinants of male fertility of male fertility determinants of sperm quality and fertility in domestic animals. *Reproduction*, 134: 3-17.
 43. Pickett BW, Amann RP (1993): Cryopreservation of semen. Philadelphia pp: 768-789. In Mc Kinnon, AO and Voss, EL *Equine Reproduction*. Lea and Febiger.
 44. Pommer AC, Linfor JJ, Mayers SA (2002): Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in commercial semen extender. *Theriogenology*, 57: 1493-1501.
 45. Purdy PH (2006): A review on goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research*, 63: 215-225.
 46. Rodriguez-Martinez H, Wallgren M (2011): Advances in boar semen cryopreservation review article. *Vet. Med. Int.*, 1-5.
 47. Ruiz -Pesini E, Alvarez E, Enriquez J, Lopez-Perez M (2001): Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Int. J.And*, 24: 335-340.
 48. Thibier M, Guerin B (2000): Hygienic aspects of storage and use of semen for animal insemination. *Anim Reprod Sci*, 62: 233-251.
 49. Thomas AD, Meyers SA, Ball BA (2006): Capacitation like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65: 1531-1550.
 50. Varner DD, Johnson L (2007): From a sperm's eye view revisiting our perception of this intriguing cell. *AAEP Proceedings*, 53: 104-177.
 51. Watson PF (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 481-492.
 52. Woelders H (1997): Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Quart*, 19: 135-138.
 53. Wongtawn TF, Saravia F, Wallgren M, Caballero I, Rodriguez-Martinez H (2006): Fertility after deep intra uterine artificial insemination of concentrated low volume boar semen doses. *Theriogenology*, 65: 773-778.
 54. Woods EJ, Gilmore JA, Liu J (2000): Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum. Reprod*, 15: 335-343.
 55. Wolk B, Leitl E, Rasch CM, Mesbah-Karimi N, Harris SB, Fahy GM (2000): Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, 40: 288-36.