



Derleme makalesi / Review article

Fare sperminin kriyoprezervasyonu

İbrahim GÜVENÇ^{1a*}, Cengiz YILDIZ^{2b}¹ Hatay İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Hatay, Türkiye² Yalova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Yalova, Türkiye

Cryopreservation of mouse sperm

MAKALE BİLGİSİ:

ARTICLE INFORMATION:

Geliş / Received:

02.05.2024

Revizyon/Revised:

25.08.2024

Kabul / Accepted:

17.10.2024

ORCID:

^a 0000-0002-9309-7133^b 0000-0002-9166-8836

Abstract:

Mice are preferred in scientific studies due to their small size, easy availability, rapid reproduction, and ability to create new generations in a short time. Since mice and humans have the same structure in terms of protein and DNA similarity, they are frequently used as experimental animals. In the studies conducted, specialized mouse breeds with various characteristics have been produced. These mice are mainly used as disease models in areas such as genetic diseases, cancer, immunology, and vaccine production in humans. The genetic resources of mutant mouse breeds produced by transgenic and mutation methods and many endangered animal species can be preserved by cryopreservation. For this purpose, sperm banks and related consortia are established for many species. Sperm cryopreservation plays a crucial role in safeguarding genetic diversity both now and in the future, ensuring the preservation and enhancement of valuable genetic traits in mice used for research and practical applications. This review aims to provide information about the cryopreservation of mouse spermatozoa.

Keywords: Mice, Spermatozoa, Cryopreservation

Fare sperminin kriyoprezervasyonu

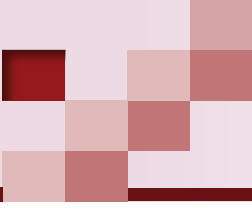
Özet:

Fareler küçük yapıya sahip olmaları, kolay temin edilmeleri, hızlı üreyebilmeleri ve kısa sürede yeni jenerasyon oluşturabilme özelliklerinden dolayı bilimsel çalışmalarda çok fazla tercih edilmektedir. Fareler ile insanlar protein ve DNA benzerliği yönünden aynı yapıya sahip olduklarından deney hayvanı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda çeşitli özellikler taşıyan özelleşmiş fare ırkları üretilmiştir. Bu fareler başlıca; insanlarda genetik hastalıklar, kanser, immünoloji, aşı yapımı gibi alanlarda hastalık modeli olarak kullanılmaktadırlar. Transgenik ve mutasyon metotları ile üretilen mutant fare ırklarının ve nesli tükenmekte olan birçok hayvan türünün genetik kaynakları kriyoprezervasyon ile korunabilmektedir. Bu amaçla birçok türler için sperm bankaları ve bununla ilgili konsorsiyumlar oluşturulmaktadır. Araştırma ve uygulamalar için değerli genetik özelliklere sahip farelerin genlerini korumak ve artırmak amacıyla sperm kriyoprezervasyonu günümüzde ve gelecekte önemli bir genetik yapıyı koruma kaynağı olacaktır. Bu derlemede fare sperminin kriyoprezervasyonu hakkında bilgiler verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Fare, Spermatozoa, Kriyoprezervasyon

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: i.guven@hotmai.com

How to cite this article: Güvenç İ ve Yıldız C (2024). Fare sperminin kriyoprezervasyonu. *Antakya Vet. Bil. Derg.*, 3(2), 50-57.



Giriş

Genetik hastalıkların tedavisi ve önlenmesi konusunda transgenik deney hayvanlarının kullanımı araştırmalarda önemli bir rol oynamaktadır. Fareler genetik araştırmalarda sıklıkla tercih edilen model organizmalardır. Birçok memeli türünün spermi 1950' li yıllara kadar başarıyla dondurulsa da fare sperminin başarılı bir şekilde dondurulması ve çözüm sonu canlılık 1990 yılında rapor edilmiştir (Tada ve ark., 1990). Fare sperminin dondurulması konusundaki bu çalışmalar, genetik ve biyomedikal araştırmalar için büyük bir adım olmuştur ve bu yöntemler, modern genetik araştırmaların temel taşlarından biri haline gelmiştir. Son yıllarda birçok hayvan türünün spermi başarılı şekilde dondurulmakta, -196°C' deki sıvı azot içerisinde uzun süreli olarak saklanabilmektedir. Hayvan türlerine göre spermatozoonların başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu farklılıklar göstermesine rağmen son 30-40 yılda önemli derecede standardize edilmiştir (Hammerstedt ve ark., 1990).

Gelişen teknikler ile birlikte dondurma ve çözündürme işlemleri sonrası %50 oranından daha fazla motilite ve fertilite elde edilmektedir. Ancak güncel kriyoprezervasyon tekniklerinin çoğunun sperm yapısı, fonksiyonu ve fertilite parametreleri üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Kriyoprezervasyonun akrozom bütünlüğü ve yapısında bozulmaya, hücresel enerji üretiminde rol alan mitokondrilerde bozukluklara, motilitenin düşmesine, DNA hasarına neden olmasından dolayı sperm hücrelerinin hayatta kalma sürelerini azalttığı ve fertilite parametrelerini düşürdüğü rapor edilmiştir (Wongtawan ve ark, 2006). Dondurma işlemi soğuk stresi nedeniyle hücre membranındaki fosfolipid yapılarını etkilemekte, hücre membran geçirgenliğini ve fonksiyonunu değiştirmektedir (Lessard ve ark, 2000). Kriyoprezervasyonun başarısı, kullanılan sulandırıcıların tipi, kriyoprotektan maddeler arasındaki etkileşim, dondurma ve çözündürme hızı, hayvanlar arası bireysel farklılıklar, sperm depolama şekli gibi birçok unsurlara bağlıdır. Kriyoprezervasyonda sadece dondurma sırasında değil dondurma öncesinde yapılan işlemlerde de spermde kayıplar meydana gelmektedir. Motilite spermatozoonlar fertilite yeteneği hakkındaki en güçlü in vitro veri olmasına karşın dondurma-çözündürme sonrası tam olarak güvenilir bir fertilite parametresi değildir (Samper ve ark., 1991). Kriyoprezervasyon işlemi sonrasında fertilite oranlarını iyileştirmek amacıyla dünya genelinde ve ülkemizde çalışmalar hızla devam etmektedir.

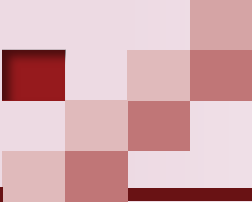
Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar fare sperminin dondurulmasında kullanılan dondurma-çözündürme işlemleri sırasında hücre ve dokularda meydana gelebilecek zararları önlemek için kullanılan kimyasal ajanlardır. Genellikle koruyucu etkilerini buldukları ortamdaki donmamış fraksiyonu artırıp iyon miktarını azaltarak oluştururlar (At ve ark., 1996). Kriyoprotektanlar hücrelerin dondurulması sırasında meydana gelen soğuk şoku, hücre içi kristal oluşumu, çözülme sırasındaki dekriztalizasyon membransal destabilizasyon durumlarına karşı koruyucu etki gösterir (Bucak ve Tekin, 2007).

Kriyoprezervasyon işlemi öncesinde sperm kriyoprotektan maddelerle ekilibrazyona bırakılarak, hücre içi ve hücre dışı dengelenmeleri sağlanır. Bu maddelerin düşük molekül ağırlıkta olmaları ve toksik etkilerini ancak belirli dozlarda göstermeleri en önemli özellikleri arasında gösterilmektedir. Hücrelerin başarılı bir şekilde dondurulması için, suyun ve kriyoprotektan maddelerin plazma membranından basit difüzyon ve hızlı transtport özellikte olması gerekir. Ayrıca membranlarda taşıma işleminde görevli protein yapıda olan su kanalları (aquaporin) tespit edilmiştir. Bu proteinlerin sulandırıcılara katılmasıyla hücrelerin soğuk zararlarına karşı dayanıklılığı artmaktadır (Edashige ve ark., 2006).

Düşük molekül ağırlığına sahip hücre içerisine girebilen (internal) kriyoprotektanlar, dimetilsülfoksit (DMSO), propilen glikol, gliserol, 2,3 bütanediol, etilen glikol (EG), 1,2 propanediol ve diğer bazı alkoller bu sınıfa dahildir (Sağırkaya ve ark., 2001). Bu tarz kriyoprotektanlar hücre içerisine girerek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu -40°C'ye kadar aşağı çekerler ve hem hücre içi hem hücre dışı etki gösterebilirler (Pickett ve Amann, 1993). Bu tür kriyoprotektanlar donma sırasında elektrolit yoğunluğunu düşürür, dehidrasyonu düzenleyerek hücresel yapıları korur ve düşük sıcaklıkların oluşturduğu ozmotik büzüşme oranını azaltırlar.

Hücre membranından geçemeyen (eksternal) kriyoprotektanlar, sıvı ve katyonlara karşı membran geçirgenliğinde artış oluşturarak ozmotik strese karşı membranlarda esneklik meydana getirir ve donma-çözünme sırasında oluşan lipit peroksidasyonunu düşürür. Eksternal kriyoprotektanlar, sakkaritler ve makromoleküller olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu kriyoprotektanlar hücre dışı ortamdaki ozmotik basıncı yükselterek suyun spermatozoon içerisinden dışarı doğru çıkmasına neden olur, bu olayın hücre içi buz



kristallerinin oluşumu engelleyerek fiziksel zararları önlediği düşünülmektedir (Steinmann, 1996).

Makromoleküllerden en önemlisi olan BSA (bovine serum albümin)'nin membranlar üzerinde koruyucu etkisi bulunmaktadır. Hücre membranında bulunan kolesterolün akmasını önleyerek ve antioksidan özelliği ile dondurma-çözdürme esnasında açığa çıkan serbest radikalleri elimine ederek etki gösterirler (De Leeuw ve ark., 1993).

Glukoz, rafinoz, sükroz ve trehaloz sakkaritlere örnektir. Sakkaritler hücrelerde dehidrasyon oluşturarak intrasellüler kristalizasyonu, membranlardaki fosfolipit yapılarla bir araya gelerek membran hasarını ve çözünme sırasında oluşabilecek ozmotik şişmeyi önlemektedir (Rudolph ve Crowe, 1985). Dondurma-çözdürme sonrası daha iyi sonuçlar elde etmek amacıyla yumurta sarısı, glisin, sitrat gibi kriyoprotektanlar da solüsyonlara katılmaktadır.

Hem internal hem eksternal kriyoprotektanların spermatozoonlara bazı zararlar verdiği bildirilmiştir. Bu zararlar ozmotik basınç kaynaklı oluşan fiziksel hasarlar veya hücresel yapıların biyokimyasal bozukluklarından oluşur (Wowk ve ark., 2000).

Nakagata ve ark. (2000) çalışmalarında kullanılan %18 rafinoz ve %3 yağsız süt tozu genellikle fare sperminin dondurulmasında kullanılmaktadır.

Kriyoprezervasyon Mekanizması ve Kriyohasar

Kriyoprezervasyon esnasında ekstrasellüler solüsyon/medyum -5°C ila -100°C'de kendiliğinden veya etkime yoluyla kristalleşirken, intrasellüler solüsyon hücre membranının etkisiyle henüz donmamıştır. Ekstrasellüler kısmın buzlaşması sebebiyle bu ortamda bulunan maddelerin yoğunluğu artmaktadır. Bu durum hücre içi ve dışındaki kimyasal maddelerde yoğunluk farkının oluşmasına sebep olur. Oluşan farklı denge ve yapı sebebiyle hücre içindeki bir miktar sıvının dışarı çıkması ile hücre içerisinde yoğunluk artışı meydana gelir ve sonrasında hücre içerisinde de buz kristalleri oluşmaya başlar. Hücrelerin dondurulması sırasında meydana gelen bu oluşumlar çözdürme esnasında da (ters yönde dekrizalizasyon halinde) meydana gelir (Mazur, 1990).

Kriyohasar

Kriyohasar fare sperminin dondurulması ve saklanmasıyla karşılaşılacak önemli sorunlardan biri olup, bu hasarın en aza indirilmesi için uygun kriyoprotektanların ve dondurma protokollerinin uygulanması önemlidir. Soğutma zararı

(kriyohasar) soğuk şoku, hiperozmotik stres, ozmotik büzüşme-şişme gibi sebepler sonucu meydana gelmektedir. Soğuk şokuna maruz kalan hücrelerde oluşan zararlar, intrasellüler dehidrasyon, membran yapısında bulunan lipit ve proteinlerde denatürasyon, akrozomal enzimlerin salınımı, spermde motilite kaybı ve dairesel hareket, hücre ve endoplazmik retikulumda ozmotik şişme olarak sıralanabilir (Curry ve Watson, 1994; Sing ve ark., 1996; Watson 1995; Watson 2000; Woods ve ark., 2000). Bu zararlı etkiler sonucunda hücrelerde serbest radikal maddelerin oluşumu, ATP sentezinde problemler, apoptozis, polispermi, tetraploidi ve en nihayetinde fertilitate kaybı oluşmaktadır (Shaw ve ark., 2000).

Kristal oluşumu

Fare sperminin kriyoprezervasyonu sırasında oluşan buz kristalleri spermatozoonların canlılığını ve kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir. Kristalleşme endotermik süreç olup, sıvılardaki kristalleşme esnasında ortamdaki donamamış fraksiyonun fiziksel özelliği değişmekte, kristalleşme sonucunda açığa çıkan gaz ortam vizkozitesini yükseltmekte ve pH değişikliklerine sebep olmaktadır. Kristalleşmenin oluşturduğu stres, hücrelerde ozmotik büzüşmeye ve membranlardaki lipit yapısında değişikliklere sebep olmaktadır (Watson, 1995; Woods, 2000).

Ozmotik stres ve ozmotik şişme

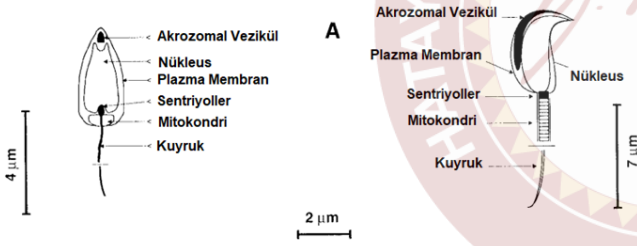
Donma sürecinin başarısını etkileyen en önemli faktör hücrelerde oluşan ozmotik strestir. Ozmotik stres hücre içi ve hücre dışı ortamdaki ozmotik değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Bu farklılığın hesaplanması, hücrelerden uzaklaştırılacak sıvının oranını belirlemede, uzaklaştırılacak su oranı da ortama ilave edilecek kriyoprotektan maddelerin yoğunluğu ile ilişkilidir (Curry ve Watson, 1994). Kriyoprotektan maddeler buldukları ortamı hiperozmotik hale getirmekte, hücre içerisine girdiklerinde hücrelerde dehidrasyona neden olmaktadır. Bu maddeler ortamdaki uzaklaştırıldığında hücreler tekrar şişerek izoozmotik basınca ulaşmaktadır (Woelders, 1997). Ozmotik basınç değişimleri kritik noktaları aştığında, hiperozmosize bağlı olarak dönüşümü olmayan bir membran yıkımı oluşturur. Hücrelerde küçük porların olması, potasyum ve sodyum iyonlarının giriş-çıkışlarını sağlayarak, hücrenin hipoozmotik stres ve koloidal ozmotik hemolize daha duyarlı hale getirir. Bu olumsuz durumu önlemek için kriyoprotektanlar ortama kademeli olarak ilave edilmeli ve hücrelerin eksternal kriyoprotektan içeren sıvılarıyla muamele edilmesi gerekmektedir (Gao ve ark., 1993; Kasai, 2002; Pedro ve ark., 1997).



Fare Sperminin Dondurulması

Fare Sperm Morfolojisi

Kemirgenlerde spermatozoonların in vitro özellikleri, spermatozoona ait membran lipid içeriği ve bileşimindeki biyokimyasal farklılıklardan ötürü diğer memeli spermatozoonlarından kısmen farklıdır (Parks ve Lynch, 1992). Kemirgenlerin spermatozoonları morfolojik olarak diğer memelilere kıyasla kanca benzeri bir baş, daha uzun bir orta kısım ve kuyruk yapısına sahiptir (Şekil 1) (Cardullo ve Baltz, 1991). Santrifüj, pH, viskozite, ozmotik stres gibi bir takım çevre değişikliklerine karşı son derece hassastır ve bu nedenle kriyoprezervasyonu diğer memeli spermatozoonlarından daha zor olduğu kanıtlanmıştır (Varisli ve ark., 2009; Nakatsukasa ve ark., 2003; Chulavatnatol, 1982; Si ve ark., 2006).



Şekil 1. Fare Spermatozoon Anatomisi (Darszon ve ark., 2002)

Elektroejekülatör yardımıyla sperm alma yönteminde, erkek farelerin rektumunda bulunan gaita masaj yöntemiyle boşaltıldıktan sonra uygun ebatlardaki prob serum fizyolojik ile kayganlaştırılarak rektuma yerleştirilir. Belli aralıklarla gönderilen elektriksel uyarım ejakülasyonu teşvik eder ve sonrasında sperm 25 µl'lik kapillar pipete alınır. Sperm alındıktan sonra üretranın veziküler bez salgılarıyla kapanmasını engellemek için glans penisteki koagulum forseps yardımıyla temizlenir (Anderson ve ark., 1983; Tecirlioğlu ve ark., 2002).

Fare öldükten sonra kauda epididimisten sperm alınmasında erkek fareler servikal dislokasyon yöntemiyle öldürülür. Daha sonra abdomen laparoskopisiyle genital organlar dışarı çıkartılır ve yağ dokularından arındırılarak kauda epididimiler ayırılır. Alınan kauda epididimiler uygun bir sperm medyumu içerisine alınarak cerrahi makas yardımıyla en az beş yerinden kesilerek sperm medyum içerisine dağılması sağlanır. Son olarak epididimis parçaları medyum içerisinden uzaklaştırılarak sperm süspansiyonu elde edilmiş olur (Akman, 2007).

Farelerde in vitro deneylerde ejakülat yerine epididimal sperm kullanılmaktadır. Ejaküle edilmiş fare spermının toplanması, epididimal sperm elde etmekten çok daha zor ve pahalıdır (Li ve ark., 2015). Ayrıca, çeşitli memeli türlerinde suni vajen ve elektroejakülasyon yöntemiyle sperm toplanabildiği halde farelerde sperm toplamak için uygun bir suni vajen yoktur ve elektroejakülasyon yöntemiyle elde edilen sperm fertilitite oranları düşüktür (Tecirlioğlu ve ark., 2002; Li ve ark., 2016). Epididimal fare spermi motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oositle fertilizasyon kabiliyetine sahiptir (Chang, 1984). Böylece kauda epididimisten elde edilen fare spermının, olgun sperm ile aynı işlevlere sahip olduğu görülmektedir.

Fare Spermının Dondurulması

Fare spermi, dondurma aşamaları sırasında meydana gelecek hasarlar yönünden diğer evcil hayvanlarının spermine göre daha hassastır (Agca ve ark., 2003) Bu hassas yönleri, dondurma sırasında oluşan serbest oksijen radikallerine, soğuk şokuna, santrifüj, pipetleme, karıştırma gibi mekanik stres faktörlerine karşı duyarlı olmaları, spermatozoon baş kısmının diğer türlerden farklılık göstermesi, zayıf membran yapısına sahip olmalarından dolayı ortamdaki ozmotik basınç değişikliklerini tolere edebilme güçlerinin sınırlı olması olarak sayılabilir (Noiles ve ark., 1997; Songsasen ve Leibo, 1997;

Farelerden Sperm Alınması

Farelerden sperm 3 farklı yöntemle alınmaktadır. Bu yöntemler, dişi genital kanaldan alınması, elektroejakülasyon yöntemiyle alınması ve kauda epididimisten alınması olarak sıralanabilir.

Dişi genital kanaldan sperm alınması yönteminde, erkek ve dişi fareler aynı kafese konulur ve çiftleşmeleri için beklenir, çiftleşme olup olmadığının tespiti amacıyla vaginal tıkaç kontrolü yapılır. Dişide vaginal tıkaç tespit edildikten sonra servikal dislokasyon ile ötenazi yapılır. Ardından laparotomi uygulanarak genital organlar dışarı alınır. Bir tanesi ovaryumlar ile uterus arasına diğeri vaginal tıkaçın hemen kranialine olmak üzere iki ligatür atılır. Ligatürler arasında kalan genital organlar bir makas yardımıyla dışarı alınarak uygun bir solüsyonla yıkanır ve sperm steril bir tüpe alınır (Songsasen ve Leibo, 1998).



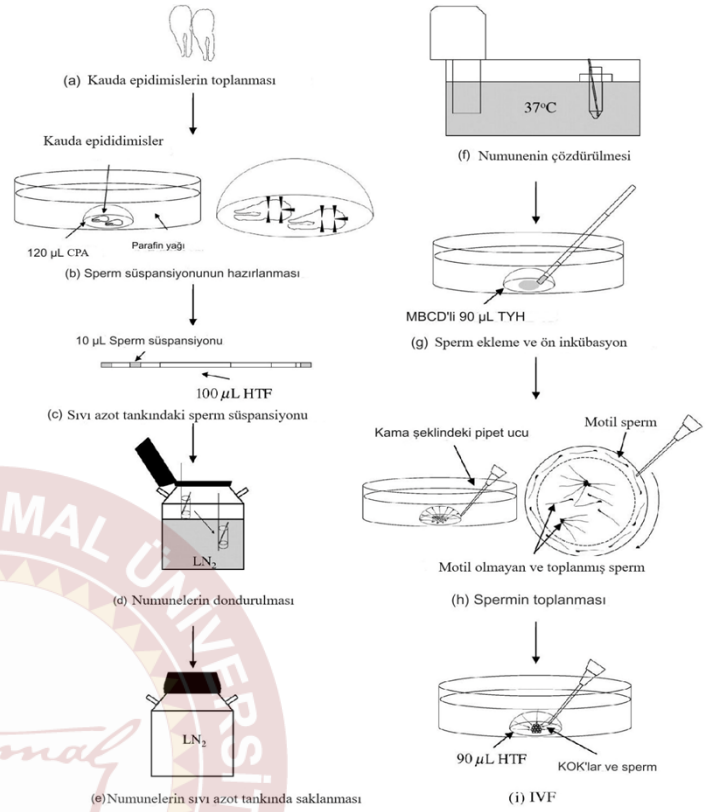
Storey ve ark., 1998; Katkov ve ark., 1998; Dewit ve ark., 2000; Koshimoto ve ark., 2000; Koshimoto ve Mazur., 2002). Fare sperminin çeşitli biyolojik özellikleri nedeniyle kriyoprotektanların dondurma medyumuna eklenmesi (CPA), sperm membranının ozmotik basınç değişimlerine karşı tepkisini değiştirir ve plazma membran bütünlüğü olumsuz etkilenir. Dondurulan sperm çözülmesi ve kriyoprotektanın ortamdaki uzaklaştırılması sürecinde de oluşan ozmotik basınç değişiklikleri plazma membran bütünlüğünde bozukluklara sebep olmaktadır. Bu süreçte doğru kriyoprotektan kullanımı ve uygun çözülme protokollerinin uygulanması, sperm hücrelerinin canlılığını ve fonksiyonlarını korumak için kritik öneme sahiptir (Songsasen ve Leibo, 1997; Koshimoto ve Mazur, 2002).

Fare sperminin dondurulmasında farenin genetik kökeni etkilidir. İnbred türlerin spermi outbred türlerin spermine göre çözüm sonrasında daha düşük canlılığa sahiptir. Kawase ve ark. (2004) yaptığı çalışmada dondurulmuş çözülürmüş sperm ile IVF yapılmış, outbred türlerde daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir.

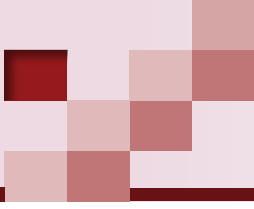
Fare sperminin dondurulmasında günümüze kadar birçok yöntem ve hücre içi ve hücre dışı birçok kriyoprotektan farklı çalışmalarda denenmiştir. Diğer memeli türlerinden farklı olarak Raffinoz/ Yağsız Süt Tozu sulandırıcısı epididimal fare sperminin dondurulmasında 20oC/ dk hızında en iyi sonuçları verdiği birçok çalışmacı tarafından gösterilmiştir (Sztejn ve ark., 2001; Nakagata ve ark., 2000; Tada ve ark., 1993; Tada ve ark., 1990; Thornton ve ark., 1999).

Takeo ve Nakagata' nın (2010) yaptığı çalışma, farelerde kriyoprezervasyonun başarılı bir şekilde uygulanması için gereken teknik ayrıntılara ışık tutar (Şekil 2).

Fare sperminin kriyoprezervasyonu üzerine son beş yılda yapılan bazı çalışmaların özetleri Tablo 1'de sunulmuştur.



Şekil 2: Şekilde, Takeo ve Nakagata'nın (2010) fare sperminin kriyoprezervasyonu ve *in vitro* fertilizasyonu (IVF) şematik anlatımı **a)** Kauda epididimlerin toplanması **b)** Epididimlerin 120 µL koruyucu ajan (CPA) içerisine alınarak makasla parçalanması **c)** Hazırlanan sperm süspansiyonunun alikotlara bölünerek 0,25 ml'lik payetlere aktarılması **d)** Payetlerin 10 dakika boyunca sıvı azot (LN₂) buharında soğutulup ardından sıvı azot tankına daldırılması **e)** Örneklerin sıvı azot tankında süresiz olarak saklanması **f)** Depolanan örneklerin tanktan alınıp 37 °C'de 10 dakika boyunca su banyosunda çözülmesi **g)** 10 µL sperm süspansiyonunun, 90µL'lik Metil-β-Siklodekstrin (MBCD) katılmış bir modifiye edilmiş Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu (THY) medyumuna ile 37 °C'de 30 saniye inkübe edilmesi **h)** Motil ve motil olmayan spermatozoonların ayrılması ve motil spermatozoonların toplanması **i)** Toplanan Sperm süspansiyonunun, kumulus-osit kompleksleri (KOK) ile birlikte 90 µL HTF (human tubal fluid) solüsyonunda 5-6 saat boyunca inkübe edilmesi ve döllenmenin şekillenmesi (IVF; In vitro fertilizasyon)



Tablo 1. Fare Sperminin Kriyoprezervasyonu Üzerine Son 5 Yılda Yapılmış Bazı Önemli Çalışmalar

ARAŞTIRMACI	YIL	ARAŞTIRMANIN AMACI	SULANDIRICI	SONUÇ
Rezaei ve ark.	2020	Fare sperminin dondurulmasında sulandırıcıya L-Karnitin ilavesinin çözdürme sonrası akrozom ve kromatin bütünlüğü, oksidatif stres ve apoptoz üzerindeki etkisinin araştırılması	%18 rafinoz+%3 yağsız süt tozu içeren sperm sulandırıcısına 2.5 ve 5mM L-Karnitin	Sonuç olarak L-Karnitin oksidatif stresin zararlı etkilerinin azalttığından sperm kalite parametrelerini artırdığı, 5mM L-Karnitin kromatin bütünlüğü açısından daha iyi sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir.
Mochida ve ark.	2021	Fare sperminin kolay ve hızlı şekilde dondurulması	%20 rafinoz solüsyonu	Kauda epididimisten alınan örneklerin % 20 rafinoz solüsyonunda, -80 °C de, 1 ay %51, 3 ay bekletilmesi halinde %25 fertilizasyon yeteneklerinin olduğunu buda dünyanın her yerindeki yüksek genetik özelliklere sahip fare depolarının acil durumlara karşı geçici olarak korunabilecek bir metod olduğunu bildirmişlerdir.
Yıldız ve Koçak	2023	Fare sperminin dondurulabilirliği üzerine Ferulik asit, Triptofan ve L-Glutamin' in etkisi	%18 rafinoz+%3 yağsız süt tozu içeren sperm sulandırıcısına Ferulik asit (0,1mM, 1 mM ve 10 mM), Triptofan (5 mM, 25 mM ve 50 mM) ve L-Glutaminin (10 mM, 50 mM ve 100 mM)	Fare sperm sulandırıcısına 10 mM L-Glutamin ilavesinin spermatolojik özellikler üzerinde olumlu etkilerinin olduğu, Ferulik asit ilavesinin sperm kalite parametrelerine olumlu etki yapmadığı hatta 10 mM Ferulik asitin toksik etki yaptığı ve Triptofan ilavesinin olumlu etki yapmadığını bildirmişlerdir.
Yıldız ve Erol	2024	Fare sperm sulandırıcısına düşük yoğunluklu lipoprotein ilavesinin dondurma çözdürme sonrası sperm kalitesi ve nükleer DNA kalitesi üzerine etkisi	%18 rafinoz , % 3 yağsız süt içerisine farklı konsantrasyonlarda LDL (% 2.5, %5.0, %7.5, %10)	Sulandırıcıya %2.5 LDL ilavesinin dondurma sonrası spermatolojik kalite parametrelerini iyileştirdiği ve fare sperminin dondurulması ve korunmasında daha yüksek oranda soğuk şokuna karşı koruyucu etki gösterdiği için kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Sonuç ve Öneri

Sperm, embriyo, kan ve doku gibi fare materyallerinin dondurulmuş olarak stoklanması ve taşınması, canlı hayvan sevkياتına kıyasla etik ve lojistik açıdan daha avantajlıdır. Sperm dondurularak sevk edilmesi hayvan refahı sorunlarını en aza indirir ve canlı hayvan taşımacılığı ile ilgili gümrük düzenlemelerini kolaylaştırır (Raspa ve ark., 2017). Fare sperm ve embriyolarının -196°C sıcaklıkta sıvı azot içerisinde arşivlenmesi geleneksel bir yöntem haline gelmiştir. Ancak gelişen dondurma ve çözdürme protokollerinin uygulanması nedeniyle sperm dondurulması daha kullanışlı bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca dondurulmuş sperm dondurulmuş embriyoya kıyasla dondurma sonrasındaki sıcaklık değişimlerine daha az duyarlıdır. Fare sperminin işlenmesi ve uzun süreli saklanması alanında yapılan araştırmalar hala devam etmektedir. Araştırma ve uygulamalar için değerli genetik özelliklere sahip farelerin genetik Güvenç ve Yıldız, 2024

kaynaklarını korumak ve genetik kapasitesini artırmak amacıyla sperm kriyoprezervasyonu günümüzde ve gelecekte önemli bir genetik yapıyı koruma kaynağı olacaktır. Bu alanda daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

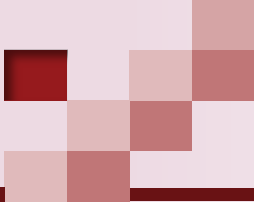
Teşekkür: Bu derleme 'Fare ve Rat Spermasının Kriyoprezervasyonu' isimli doktora seminerinden üretilmiştir.

Mali Destek: Bu çalışma herhangi bir finansman kuruluşundan/sektöründen hibe/destek almamıştır.

Etik Beyanı: Bu çalışmanın yapılmasında Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul (HADYEK) İzin Belgesi gerekmemektedir.

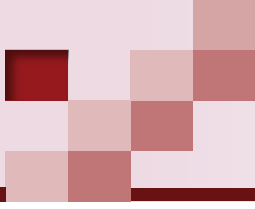
Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazar Katkıları: Tüm yazarlar derleme çalışmasının yazılması ve düzenlenmesinde eşit oranda katkıda bulunmuşlardır.



Kaynaklar

1. Agca, Y., Gilmore, J., Byers, M., Woods, E. J., Liu, J., & Critser, J. K. (2002). Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1493-1501. Doi: 10.1095/biolreprod.102.005579
2. Akman, O. (2007). Swiss albino ırkı farelerde sperma kalitesinin belirlenmesi amacıyla hos testi sonuçları ve diğer spermatolojik parametreler arasındaki ilişkinin araştırılması. Selçuk Üniv.Sağ.Bil.Enst. Doktora tezi. 2007
3. Anderson, R. A., Oswald, C., Willis, B. R., & Zaneveld, L. J. D. (1983). Relationship between semen characteristics and fertility in electroejaculated mice. *Reproduction*, 68(1), 1-7. Doi:10.1530/jrf.0.0680001
4. At, P. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.*, 14, 127-149.
5. Bucak, M. N., & Tekin, N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73(1-3), 103-108. Doi: 10.1016/J.Smallrumres.2006.12.001
6. Cardullo, R. A., & Baltz, J. M. (1991). Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell motility and the cytoskeleton*, 19(3), 180-188. Doi: 10.1002/Cm.970190306
7. Chang, M. C. (1984). The meaning of sperm capacitation. A historical perspective. *Journal of andrology*, 5(2), 45-50. Doi: 10.1002/J.1939-4640.1984.Tb00775.X
8. Chulavatnatol, M. (1982). Motility initiation of quiescent spermatozoa from rat caudal epididymis: effects of pH, viscosity, osmolality and inhibitors. *International Journal of Andrology*, 5(4), 425-436. Doi: 10.1111/J.1365-2605.1982.Tb00272.X
9. Curry, M. R., & Watson, P. F. (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, 31(1),39-46. Doi: 10.1006/Cryo.1994.1005
10. Darszon, A., Espinosa, F., Galindo, B., Sánchez, D., & Beltrán, C. (2002). Regulation of sperm ion currents. In *Fertilization* (pp. 225-264). Academic Press. Doi:10.1016/B978-012311629-1/50009-7
11. De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30(1), 32-44. Doi: 10.1006/Cryo.1993.1005
12. Dewit, M., Marley, W. S., & Graham, J. K. (2000). Fertilizing potential of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. *Cryobiology*, 40(1), 36-45. Doi: 10.1006/Cryo.1999.2219
13. Edashige, K., Yamaji, Y., Kleinhans, F. W., & Kasai, M. (2003). Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 68(1), 87-94. Doi: 10.1095/biolreprod.101.002394
14. Gao, D. Y., Ashworth, E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., & Critser, J. K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of reproduction*, 49(1), 112-123. Doi: 10.1095/Biolreprod49.1.112
15. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan J.P.(1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl*, 11: 73-88. Doi: 10.1002/J.1939-4640.1990.Tb01583.X
16. Kasai, M. (2002). Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reproductive Medicine and Biology*, 1, 1-9.
17. Katkov, I. I., Katkova, N., Critser, J. K., & Mazur, P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, 37(4), 325-338. Doi: 10.1006/Cryo.1998.2128
18. Kawase, Y., Aoki, Y., Kamada, N., Jishage, K. I., & Suzuki, H. (2004). Comparison of fertility between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization with a partial zona pellucida incision by using a piezo-micromanipulator in cryopreserved inbred mouse spermatozoa. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 43(1), 21-25.
19. Koçak, G., & Yildiz, C. (2024). The Effects of Ferulic Acid, Tryptophan, and L-Glutamine on the Cryopreservation of Mouse Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 22(3), 286-293. Doi: 10.1089/Bio.2023.0067
20. Koshimoto, C., Gamliel, E., & Mazur, P. (2000). Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology*, 41(3), 204-231. Doi: 10.1006/Cryo.2000.2281
21. Koshimoto, C., & Mazur, P. (2002). Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology*, 45(1), 49-59. Doi: 10.1016/S0011-2240(02)00105-0
22. Lessard, C., Parent, S., Leclerc, P., BAILEYs, J. L., & Sullivan, R. (2000). Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of andrology*, 21(5), 700-707. Doi: 10.1002/J.1939-4640.2000.Tb02138.X
23. Li, H., Hung, P. H., & Suarez, S. S. (2015). Ejaculated mouse sperm enter cumulus-oocyte complexes more efficiently in vitro than epididymal sperm. *PLoS One*, 10(5), e0127753. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0127753
24. Li, M. W., Glass, O. C., Zarrabi, J., Baker, L. N., & Lloyd, K. K. (2016). Cryorecovery of mouse sperm by different IVF methods using MBDCD and GSH. *Journal of fertilization in vitro*, 4(2). Doi: 10.4172/2375-4508.1000175
25. Mazur, P. (1990). Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell biophysics*, 17, 53-92.
26. Mochida, K., Hasegawa, A., Shikata, D., Itami, N., Hada, M., Watanabe, N., ... & Ogura, A. (2021). Easy and quick (EQ) sperm freezing method for urgent preservation of mouse strains. *Scientific Reports*, 11(1), 14149.
27. Nakagata, N. (2000). Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mammalian Genome*, 11(7), 572-576. Doi: 10.1007/s003350010109
28. Nakatsukasa, E., Kashiwazaki, N., Takizawa, A., Shino, M., Kitada, K., Serikawa, T., ... & Nakagata, N. (2003). Cryopreservation of spermatozoa from closed colonies, and inbred, spontaneous mutant, and transgenic strains of rats. *Comparative medicine*, 53(6), 639-641.
29. Noyles, E. E., Thompson, K. A., & Storey, B. T. (1997). Water permeability, Lp, of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology*, 35(1), 79-92. Doi: 10.1006/Cryo.1997.2033
30. Parks, J. E., & Lynch, D. V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2), 255-266. Doi: 10.1016/0011-2240(92)90024-V



31. Pedro, P. B., Zhu, S. E., Makino, N., Sakurai, T., Edashige, K., & Kasai, M. (1997). Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. *Cryobiology*, 35(2), 150-158. Doi: 10.1006/Cryo.1997.2034
32. Pickett, B. W., & Amann, R. P. (1993). Cryopreservation of semen. *Equine reproduction*, 775, 780.
33. Raspa, M., Guan, M., Paoletti, R., Montoliu, L., Ayadi, A., Marschall, S., ... & EMMA/Infrafrontier Technical Working Group. (2017). Dry ice is a reliable substrate for the distribution of frozen mouse spermatozoa: A multi-centric study. *Theriogenology*, 96, 49-57. Doi: 10.1016/J.Theriogenology.2017.04.003
34. Rezaei, N., Mohammadi, M., Mohammadi, H., Khalatbari, A., & Zare, Z. (2020). Acrosome and chromatin integrity, oxidative stress, and expression of apoptosis-related genes in cryopreserved mouse epididymal spermatozoa treated with L-Carnitine. *Cryobiology*, 95, 171-176. Doi: 10.1016/J.Cryobiol.2020.03.006
35. Rudolph, A. S., & Crowe, J. H. (1985). Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, 22(4), 367-377. Doi: 10.1016/0011-2240(85)90184-1
36. Sağırkaya, H. (2001). Değişik gelişim dönemlerinde bulunan hibrit fare embriyolarının vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması (Doctoral dissertation, Bursa Uludağ University (Turkey)).Uludağ Üniv.Sağ.Bil.Enst. Doktora tezi. 2001
37. Samper, J. C., Hellander, J. C., & Crabo, B. G. (1991). Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 44, 107-114.
38. Songsasen, N., & Leibo, S. P. (1997). Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 35(3), 240-254. Doi: 10.1006/Cryo.1997.2048
39. Songsasen, N., & Leibo, S. P. (1998). Live mice from cryopreserved embryos derived in vitro with cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Comparative Medicine*, 48(3), 275-281.
40. Storey, B. T., Noiles, E. E., & Thompson, K. A. (1998). Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 37(1), 46-58. Doi: 10.1006/Cryo.1998.2097
41. Sirat, M. P., Sinha, A. K., Singh, B. K., & Prasad, R. L. (1996). Effect of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 45(2), 405-416. Doi: 10.1016/0093-691x(95)00377-K
42. Si, W., Benson, J. D., Men, H., & Critser, J. K. (2006). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*, 53(3), 336-348. Doi: 10.1016/J.Cryobiol.2006.09.001
43. Spencer, G. International Team of Researchers Assembles Draft Sequence of Mouse Genome. <https://www.genome.gov/10002983/2002-release-draft-sequence-of-mouse-genome>, Erişim Tarihi: 03.01.2020. 2002.
44. Steinmann, H. (1996). Use of trehalose as a cryoprotectant in the freezing of stallion semen. A laboratory study.
45. Szein, J. M., Noble, K., Farley, J. S., & Mobraaten, L. E. (2001). Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 42(1), 28-39. Doi: 10.1006/Cryo.2001.2300
46. Tada, N., Sato, M., Yamanoi, J., Mizorogi, T., Kasai, K., & Ogawa, S. (1990). Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *Reproduction*, 89(2), 511-516. Doi: 10.1530/jrf.0.0890511
47. Tada, N. (1993). Effect of pre-freezing equilibration and post-thawing centrifugation on the fertilizing capacity of frozen mouse epididymal spermatozoa. *Cryo-Letters*, 14, 195-206.
48. Takeo, T., & Nakagata, N. (2010). 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*, 44(2), 132-137. Doi: 10.1258/La.2009.009074
49. Tecirlioglu, R. T., Hayes, E. S., & Trounson, A. O. (2002). Semen collection from mice: electroejaculation. *Reproduction, Fertility and Development*, 14(6), 363-371. Doi: 10.1071/RD02015
50. Thornton, C. E., Brown, S. D., & Glenister, P. H. (1999). Large numbers of mice established by in vitro fertilization with cryopreserved spermatozoa: implications and applications for genetic resource banks, mutagenesis screens, and mouse backcrosses. *Mammalian Genome*, 10(10), 987-992. Doi: 10.1007/s003359901145
51. Varisli, O., Uguz, C., Agca, C., & Agca, Y. (2009). Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 110(3-4), 256-268. Doi: 10.1016/J.Anireprosci.2008.01.012
52. Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891. Doi: 10.1071/RD9950871
53. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492. Doi: 10.1016/S0378-4320(00)00099-3
54. Woelders, H. (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, 19(3), 135-138. Doi: 10.1016/S0378-4320(00)00099-3
55. Wongtawan, T., Saravia, F., Wallgren, M., Caballero, I., & Rodríguez-Martínez, H. (2006). Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semendoses. *Theriogenology*, 65(4)773-787. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.07.033
56. Wowk, B., Leitl, E., Rasch, C. M., Mesbah-Karimi, N., Harris, S. B., & Fahy, G. M. (2000). Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, 40(3), 228-236. Doi: 10.1006/cryo.2000.2243
57. Yamashiro, H., & Eimei, S. (2012). Cryopreservation of rat sperm. *Current Frontiers in Cryobiology*, 165-178.
58. Yıldız, C., Erol, İ. (2024). The Effects on Post-Thaw Sperm Quality and Nuclear DNA Integrity of Supplementation of Low-Density Lipoprotein to Freezing Extender in the Mouse. *Van Veterinary Journal*, 35(1), 94-100. Doi: 10.36483/vanvetj.1417880
59. Yıldız, C., Ottaviani, P., Law, N., Ayearst, R., Liu, L., & McKerlie, C. (2007). Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction*, 133(3), 585-595. Doi: 10.1530/Rep-06-0256