

Spermatozoon liyofilizasyonu: Hayvan genetik kaynaklarının korunması için yeni bir saklama modeli olabilir mi?

İlktan Bařtan¹ , Ergun Akçay² 

¹ Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi M¼d¼rl¼đ¼ Lalahan Mamak/Ankara

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fak¼ltesi, D¼lerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 11.09.2019, **Kabul tarihi** / Accepted: 19.03.2020

zet: Her ülkenin, kendine zg¼ hayvan genetik kaynaklarını, nesli t¼kenme tehlikesine karşın veya gelecekte gen aktarım çalışmaları için koruması, önemli bir stratejik planlamadır. Gen bankalarında sıvı azot bağımlı olarak saklanan spermatozoon genetik materyallerinin, sıvı azot ile kontaminasyon riskinin bulunması ve sıvı azot ikmali aksaklıklarına bağlı olarak, spermatozoonların zarar görerek fertilizasyon yeteneğini kaybetmesi muhtemeldir. Son yıllarda sıvı azot ile spermatozoon saklama modeline alternatif olarak gösterilen spermatozoon liyofilizasyonu (dondurup-kurutarak saklama) işlemi sonucunda, spermatozoon motilite kaybı ve h¼cre membran hasarı gr¼lmesine rağmen DNA b¼t¼nl¼đ¼ korunmaktadır. Liyofilize spermatozoon genetik materyalinin, intra-sitoplazmik spermatozoon enjeksiyonu (ICSI) ile laboratuvar hayvanları başta olmak üzere yaban hayvanları ve çiftlik hayvanlarında in vitro fertilizasyon uygulaması ile yavru alınması m¼mk¼nd¼r. Bu derlemede liyofilize spermatozoon protokolleri, saklama koşulları ve in vitro fertilizasyon çalışmaları hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Gen bankası, kriyokonservasyon, dondurarak- kurutma, yardımcı üreme teknikleri.

Lyophilization of sperm: Can it be a new storage model for conservation of animal genetic resources?

Abstract: The conservation of the unique animal genetic resources for endangered or future gene transfer studies is an important strategic planning for each country. Sperm stored in gene banks are at the risk of contamination with liquid nitrogen and also sperm can be damaged and lose fertilization ability due to liquid nitrogen replenishment failure. Sperm lyophilization (freeze-drying) process, which is indicated as an alternative to sperm storage model with liquid nitrogen, preserves sperm DNA integrity despite the loss of motility and cell membrane damage of the sperm. By using of intracytoplasmic sperm injection method, it is possible to produce offsprings from lyophilized sperm samples in wild animals and farm animals as well as in laboratory animals. In this review, it was aimed to give information about lyophilized sperm protocols, storage conditions and in vitro fertilization studies.

Key words: Gen bank, cryoconservation, freeze-drying, assisted reproduction techniques.

Giriş

Her lkenin, bulunduğu çevreye uyum sağlamış, tarımsal ekosistemin halkası olan kendine zg¼ hayvan genetik kaynakları bulunmaktadır. Bu hayvan genetik kaynaklarından bazılarının nesli, bilinçsiz melezleme, avlanma ve doğal afetler gibi çeşitli unsurlarla t¼kenmiř veya t¼kenme tehlikesi altındadır. Mevcut hayvan genetik kaynaklarının, nesli t¼kenme tehlikesine karşın veya gelecekte gen aktarım çalışmaları için korunması, her ülkenin benimsediği önemli bir stratejik planlamadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım rg¼t¼ (FAO) tarafından hayvan genetik kaynaklarının korunması ve s¼rd¼r¼lebilir kullanımı için üç yöntem önerilmektedir; i) doğal yaşam alanında yetiştirici şartlarında (in situ in vivo) koruma, ii)

doğal yaşam alanı dışında özel koruma s¼r¼lerinde canlı (ex situ in vivo) koruma ve iii) spermatozoon, embriyo, oosit, somatik h¼cre ve DNA gibi genetik materyallerin dondurularak, uzun s¼reler saklanmasını sağlayan gen bankalarında (ex situ in vitro) koruma [10].

Binlerce hayvana ait genetik materyalin pratik olarak korunmasına imkan sağlayan gen bankaları, ülkemizin de dahil olduğu 64 ülkede kurulmuş, 41 ülkede de kurulmaları planlanmıştır. Hayvan genetik materyalleri arasında sperma kriyoprezervasyonu (dondurup-saklama), diğer genetik materyallere göre, kolay elde edilebilir olması ve daha pratik yavru alabilme imkânı sağlamasıyla, gen bankalarının temelini oluşturmaktadır [3]. Ancak sıvı azota

Yazışma adresi / Correspondence: İlktan Baştan, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi M¼d¼rl¼đ¼ Mamak/Ankara E-posta: ilktan@outlook.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-8155-1960 • ²0000-0002-7491-5671

bağımlı olarak kullanılan bu tekniğin, sıvı azot ile kontaminasyon riskinin bulunması ve sıvı azot ikmalı aksaklıklarına bağlı olarak, spermatozoonların zarar görebilmesini yeteneğini kaybetmesi muhtemel sonuçtur. Bu durum araştırmacıları, sıvı azot ile saklama metoduna alternatif yöntem arayışlarına yönlendirmiştir. Son dönemde yapılan araştırmalar sonucunda, bu alternatif yöntemlerin başında spermatozoon liyofilizasyonu gelmektedir [6, 16, 36, 53].

Bu derlemede, farklı memeli türlerinden, liyofilize spermatozoon protokolleri, saklama koşulları ve in vitro fertilizasyon çalışmaları hakkında güncel bilgiler sunulmaktadır, gelecekte yapılacak olan çalışmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır.

Liyofilizasyon Nedir?

Prokaryot ve ökaryot hücreler yaklaşık %70-90 oranında su içermektedir. Su hücreler içerisinde biyokimyasal aktiviteleri destekleyen, onların metabolik aktivitelerinin devam etmesini sağlayan bir çözücü olduğu gibi olumsuz koşullarda ise hücre yapısının bozulması ve otoliz süreci için gereken ortamı sağlayan bir moleküldür [9, 17]. Liyofilizasyon veya dondurarak kurutma (freeze-drying) işlemi, biyolojik materyallerin dondurulup, düşük basınç altında buzun süblimasyonu (buzun sıvı hale geçmeden uzaklaşması) ile su miktarının herhangi bir metabolik reaksiyonu desteklemeyecek seviyeye kadar azaltılması işlemidir. Böylece liyofilize edilen ürünlerin oda sıcaklığında veya +4°C'de daha az maliyetle muhafaza edilmesi ve taşınması mümkün olmaktadır [31, 54].

Liyofilizasyon Metodunun Tarihsel Gelişimi

Liyofilizasyon işleminin tarihsel gelişimi, Eskimoların avladıkları balıkları soğuk, kuru Arktik rüzgârlara maruz bırakarak suyun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Benzer uygulamalara Viking ve İnka toplumlarında da rastlanıldığı bildirilmektedir. Bu toplumlarda, basıncın ve sıcaklığın düşük olduğu yüksek tepeleri doğal yiyecek koruyucu depolar olarak kullandıkları belirtilmektedir [2, 17]. On dokuzuncu yüzyıl başlarında farklı bilim insanları tarafından bakteri, virüs, ilaç, kan ve doku liyofilizasyon çalışmaları yapılmıştır. Penisilini keşfeden bakteriyolog A. Fleming klinik çalışmalarında liyofilize mikroorganizmaları sıkça kullandığını belirterek ilk olarak "liyofilizasyon" terimini kullanmıştır [7, 14, 15, 45]. Günümüzde liyofilizasyon metodu, özellikle gıda ve ilaç endüstrisindeki ürünleri, işlevsel saklama imkânı sağladığı için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Spermatozoon Liyofilizasyonu

Tesadüfen gliserolü keşfederek başarılı spermatozoon kriyoprezervasyon çalışmaları yapan Polge ve ark. [44], aynı dönemde ilk kez horoz spermatozoonları ile liyofilizasyon çalışmaları yapmış ancak başarılı sonuç bildirilmemiştir [8, 48]. Spermatozoon liyofilizasyon çalışmaları, Wakayama ve Yanagimachi [50], tarafından yapılan çalışma ile ivme kazanmıştır. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada, liyofilize fare spermatozoonlarının hareketsiz, ölü olduklarını fakat DNA'larının bozulmadığını fark etmişler ve genetik materyali, intra-sitoplazmik spermatozoon enjeksiyonu (ICSI) yoluyla oositlerin fertilizasyonunda kullanarak, yavru alınabileceğini göstermişlerdir. Liyofilizasyon sürecinde oluşan mekanik ve ozmotik stres spermatozoon membranında hasara yol açmakta ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Ancak memeli spermatozoon nükleusu son derece stabil ve yüksek yoğunlukta, somatik hücrelere kıyasla 6 kat daha fazla kompakt ve 40 kat daha az DNA hacmi ile özgün bir DNA organizasyonuna sahiptir. Bu özgün DNA yapısı, fertilizasyon öncesi ekzojen ajanlara karşı hücreyi koruma ve hasarları asgariye indirme bakımından hayati önem taşımaktadır [52].

Spermatozoonun Liyofilizasyon Aşamaları

Spermatozoonun liyofilizasyona hazırlanması: Liyofilizasyon için taze veya dondurulmuş sperma kullanılabilir gibi epididimal spermatozoon da kullanılabilir. Liyofilizasyon öncesi spermatozoonun seminal plazma veya sperma sulandırıcılarından seperasyonu için çeşitli ayrıştırma yöntemleri (percoll gradient, swim up) uygulanmaktadır [17, 48]. Ancak, koç sperması gibi ekzojen etkenlere karşı hassas olan türler için spermatozoon ayrıştırılmadan da liyofilize edilebilmektedir [5, 40]. Liyofilizasyon için spermatozoon sulandırıcısı olarak, fetal sığır serumu, monosakkarit veya disakkaritler (trehaloz), L-glutamin, sodyum pürivat, etilen diamin tetra asetat (EDTA), esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler ve antibiyotik gibi çeşitli tampon, besin ve koruyucu madde bileşiklerinin eklendiği ticari kültür sulandırıcıları (TCM-199, DMEM, TRIS) kullanılabilir. Güncel liyofilize spermatozoon çalışmalarında ise Tris-HCl, EGTA bazlı [10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl ve 50 mmol/L etilen glikol bis (β -amino-etil-eter) tetra asetik asit (EGTA), pH 8.2] sperma sulandırıcısı ile başarılı sonuç alınan çalışmalar bulunmaktadır [17]. Sulandırılan sperma numunesi oda sıcaklığında 30 dakika ekilibrasyon sürecine bırakılmaktadır. Ekilibrasyon süreci sonrasında istenilen dozlarda (5×10^4 spermatozoa/ml gibi) dozlanarak cam veya

plastik kriyojenik tüplere aktarılır. Kriyojenik tüpler içerisindeki numuneler, sıvı azot içerisine daldırılarak (-196°C, 20-30s) veya azot gazı buharında (-140°C, 5dk) hızlı dondurma işlemi gerçekleştirilir [47, 49]. Konvansiyonel kriyoprezervasyon yönteminin aksine, dondurma işleminin hızlı yapılması, hücreler arasındaki buz kristallerinin hacminin büyük olması dolayısıyla daha başarılı liyofilizasyon işleminin gerçekleşmesi amacıyla yapılmaktadır [39].

Spermatozoon liyofilizasyonu: Genel olarak spermatozoon liyofilizasyonu üç aşamada gerçekleştirilmektedir; dondurma, esas kurutma ve son kurutma.

Spermatozoon dondurma işlemi liyofilizasyon cihazında yapılabildiği gibi, cihazı ve zamanı verimli kullanmak amacıyla, sıvı azot içerisinde veya azot gazı buharında yapılması tercih edilmektedir [13]. Dondurulmuş sperma numuneleri önceden soğutulmuş (-30°C - -80°C) liyofilizatör içerisine yerleştirilerek esas kurutma işlemine geçilir. Bu süreçte kademeli olarak sıcaklık artışı (+37°C ye kadar) ve basıncın düşürülmesi (1,98-0,03 mbar) ile numunelerdeki suyun yaklaşık %90'ı sıvı hale geçmeden doğrudan, katı buz halden gaz haline geçerek yani süblimasyona uğrayarak uzaklaştırılmaktadır (serbest suyun tamamı ve bağıl suyun bir kısmı). Geriye kalan, ürünün yapısal bütünlüğünü sağlayan bağlanmış su, esas kurutmada kullanılan daha düşük atmosferik basınç ile birlikte yüksek sıcaklık uygulanarak uzaklaştırılmaktadır [17, 48]. Genel olarak bu üç aşamada yapılan spermatozoon liyofilizasyon işlemi, son kurutma işlemi uygulanmadan, esas kurutma süresinin uzatılmasıyla (12-30 saat) iki aşamada gerçekleştirilebilmektedir [11, 29]. Liyofilize spermatozoon numuneleri, nemli ortamlardan uzak vakumlu tüpler içerisinde muhafaza edilmeli, ışıktan korunmalıdır. Öngörülen kullanım süresine göre oda sıcaklığında veya +4°C'de saklanabileceği gibi daha uzun süre muhafaza için -20°C'de veya -80°C'de saklanması önerilmektedir [6, 28].

Spermatozoon Liyofilizasyonunu Etkileyen Faktörler

Basınç ve liyofilizasyon süresi: Bu iki faktör liyofilizasyon esnasında spermatozoon fonksiyonunu önemli derecede etkileyen unsurlardır. Birbirleri arasındaki etkileşim liyofilizasyon kinetiğini ve dehidrasyon oranını belirler (Tablo 1) [20]. Esas kurutma esnasında farklı basınçlar uygulayarak liyofilize edilen fare spermatozoonları 0,37 mbar basınç altında, 1,03 ve 0,04 mbar basınca göre DNA bütünlüğü ve ICSI başarısı açısından daha iyi sonuçlar vermektedir [28]. Domuzlarda, spermatozoonun liyofilizasyon süresi-

nin 4 saatten 24 saate uzatılması, ICSI uygulamasıyla yapılan in vitro fertilizasyon başarısını, olumsuz etkilemektedir [33].

Tablo 1. Liyofilize spermatozoon ile yavru veya blastosist aşaması elde edilen çalışmalarda, kullanılan solüsyon ve liyofilizatör basınç, süre kalibrasyonu.

Tür	Basınç (mbar)	Süre (saat)	Solüsyon	Kaynak
Fare	0,001	12	CZB, DMEM ve fetal siğir serumu	[50]
Fare	0,032 ^a ve 0,040 ^b	4	Tris-HCl, EGTA	[32]
Fare	0,030 ^a ve 0,045 ^b	4	Tris-HCl, EDTA	[24]
Tavşan	0,023 ^a ve 0,040 ^b	4	Tris-HCl, EGTA	[34]
Boğa	0,19	12-18	TCM-199, fetal siğir serumu	[29]
Ayır	0,133	30	DMEM, fetal siğir serumu	[11]

^aEsas kurutma ve ^bson kurutma basınç değerleri. CZB; Chatot - Ziomek - Bavister, DMEM; Dulbecco'un Modifiye Eagle Medyumuna, EGTA; Etilen glikol tetra asetik asit, EDTA; Etilendiamin tetra asetik asit, TCM-199; Doku kültür medyumuna - 199.

Liyofilizasyon solüsyonları ve pH değeri: Liyofilizasyon işleminde kullanılacak solüsyonların spermatozoon DNA bütünlüğünün korunmasını sağlaması, liyofilizasyon sıcaklığı ve basıncında kolayca dehidre olması ve işlem sonrasında uygun şekilde rehidrasyonu önemlidir. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda araştırmacılar bu uygunluğu farklı maddelerin kombinasyonları ile sağlamaktadır. Liyofilizasyon solüsyonuna farklı maddeler ekleyerek koruyucu özelliğini artırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir [17]. Liyofilize spermatozoon kullanılarak, ICSI tekniği ile farelerde ilk başarılı yavru elde edildiği çalışmada, iki yaygın kültür medyumuna (CZB ve DMEM) eklenmiş %10 fetal siğir serumu kullanılmıştır [50]. Günümüzde yaygın olarak kullanılan liyofilizasyon solüsyonu Tris-HCl ve NaCl kombinasyonudur. Liyofilizasyon solüsyonlarına EGTA, EDTA, DMSO, Vit E, sorbitol ve laktoz ilavesi DNA bütünlüğünü korumada olumlu etki yaratmaktadır. Farklı hayvan türlerinde (fare, boğa, ayır, tavşan ve bazı yaban hayvan türleri) yapılan liyofilize spermatozoon çalışmaları sonucunda, DNA bütünlüğü için en uygun solüsyon pH değerinin 8 olduğu öngörülmektedir [1, 18, 20, 22, 23, 26, 28, 29, 32].

Liyofilize spermatozoon depolama süresi ve sıcaklığı: İn vitro veya in vivo embriyonik gelişme sağlanan çalışmalarda liyofilize fare, siçan, tavşan spermatozoonları oda sıcaklığında 1 ay muhafaza edilebilmiştir. Domuz spermatozoonlarının +4 °C'de 3 aydan daha fazla bulundurulmasının DNA bütünlüğünü olumsuz etkilediği belirtilmektedir [20, 37].

Kaneko ve Serikawa [25], taze, kısa süreli ve +4 °C'de 3 yıl süre ile muhafaza edilen liyofilize fare spermatozoonlarının, fare oositleri ile in vitro embriyonik gelişim oranları arasında, önemli bir fark olmadığını belirtmiştir. Liyofilize spermatozoonunun, +4°C'de veya oda sıcaklığında saklama süresi türlere göre farklılık göstermesine rağmen, uzun yıllar saklanma için -20°C'de veya -80°C'de saklanması önerilmektedir [6, 28].

Etkin Liyofilize Spermatozoon Çalışmaları

Spermatozoon liyofilizasyonu araştırmalarındaki temel hedef, in vitro fertilizasyon (IVF) veya suni tohumlama uygulamalarında kullanılmak üzere gerekli olan spermatozoon motilitesinin ve fertilizasyon kapasitesinin korunmasını sağlamaktır. Dondurma ve kurutma sürecinde oluşan mekanik ve ozmotik stres, spermatozoon membranında hasara yol açmakta, bunun sonucunda motilite kaybı ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Ancak spermatozoonun oosit içerisine mikroenjeksiyonu, rutin olarak birçok embriyo laboratuvarında kullanıldığı için motilite kaybı artık fertilizasyon için bir engel teşkil etmemektedir [30, 36]. Ayrıca liyofilize fare spermatozoonlarından üretilen blastosit aşamasındaki embriyolarda kromozomal anomaliler, doğan yavruların büyüme hızı ve patolojik değişiklikleri açısından taze spermatozoon ile kıyaslanabilir durumdadır. Bu durum spermatozoon genetik materyalinin liyofilizasyon ve rehidrasyon süreçlerinden etkilenmediğini göstermektedir. Aynı zamanda bu durum belli oranda DNA hasarına sahip spermatozoonun, oosit genetik materyalinde bulunan DNA onarım genlerinin aktivasyonu ile spermatozoon DNA hasarının, giderilmesiyle açıklanmaktadır [12, 19, 21, 30, 37, 51].

Liyofilizasyon sonrası boğa spermatozoonlarında, kalsiyum salınımı uyarım yeteneği, hafif ölçüde azalmakta ve bu durum oosit aktivasyonunu olumsuz etkilemekte, fertilizasyon başarısını önemli ölçüde düşürmektedir [20]. Keskintepe ve ark. [29], liyofilize boğa spermatozoonunun, oosit aktivasyonunu uyaran şelatlar (iyonomisin, 6-dimetil amino pürine) ile muamele ederek in vitro fertilizasyon çalışmalarında kabul edilebilir blastosit oranları elde etmişlerdir. Kriyoprezervasyon için en hassas DNA'ya sahip tür olan koç spermatozoonu ile liyofilizasyon çalışmaları sınırlı sayıdadır [35]. Liyofilizasyon solüsyonuna antioksidan (rosmarinik asit) ilavesi DNA bütünlüğünü artırmakta, ancak fertilizasyon oranı ve embriyonik evre gelişimi açısından önemli bir katkı sağlamamaktadır [43]. Yapılan başka bir araştırmada ise liyofilize koç spermatozoonunun, oosit içerisine mikroenjeksiyon uygulaması ile %32,8 blastosit oranı elde

edilmiştir [40]. Choi ve ark. [11], liyofilize aygır spermatozoonlarının, spermatozoon sitozol ekstratı çıkarılarak muamele edilmesinin, oosit aktivasyonuna katkı sağlayarak, kaliteli embriyo üretiminde ve yavru alınmasında destek sağlayabileceğini, çalışmalarından aldıkları iki tay ile kanıtlamışlardır. Bu çalışma laboratuvar hayvanları dışında, çiftlik hayvanlarında yavru alınan tek çalışmadır. Evcil veya vahşi hayvan türlerinden, birçok hayvanın liyofilize spermatozoonları elde edilmesine rağmen laboratuvar hayvanları dışında yavru alınan çalışmalar sınırlıdır. Bunun sebebi olarak laboratuvar hayvanlarından oosit elde edilmesinin daha pratik olmasının yanı sıra in vitro fertilizasyon sürecinde oosit aktivasyonun da daha pratik olması belirtilmektedir. Farklı hayvan türlerinden elde edilen liyofilize spermatozoon numunelerinin, fertilizasyon özelliğini belirlemek amacıyla fare oositleri ile in vitro fertilizasyon çalışmalarının yaygınlığı, bu durumu ispatlar niteliktedir (Tablo 2).

Tablo 2. Farklı türlere ait liyofilize spermatozoon çalışmaları ve başarı kriterleri.

Tür	Başarı Kriteri	Kaynak
İnsan	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[32]
Koç	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[40, 43]
Manda	DNA Bütünlüğü	[47]
Kedi	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[45]
Köpek	DNA Bütünlüğü, ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[41]
Zürafa	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[26]
Jaguar	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[26]
Şempanze	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[26]
Sansar	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[26]
Domuz	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[33]
Laboratuvar Hayvanları (Rat, Hamster, Tavşan)	DNA Bütünlüğü, ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[25, 34, 38]

ICSI; intra-sitoplazmik spermatozoon enjeksiyonu.

Sonuç

Gen bankalarında sıvı azot ile dondurulmuş spermaların saklanması pratik bir uygulama olarak görülebilir, ancak sıvı azotun sürekli buharlaşarak fire vermesi, sürekli sıvı azot ikmali gerektirmektedir [4]. Zamanında sıvı azot ikmali yapılamaması durumunda, mevcut genetik materyallerin kullanılamaz hale gelmesi, kaçınılmaz bir tehlikedir. Ayrıca sıvı azot temini, gen bankasının bulunduğu bölgeye göre değişkenlik gösteren süresiz bir ekonomik yüküdür. Bu yüzden, gen bankalarında bulunan genetik materyallerin en az iki gen bankasında, farklı yöntemler ile her olasılığa karşı yedeklenmesi FAO'nun önerileri

içerisinde [10]. Bu amaçla, son yıllarda liyofilizasyon tekniği yeni bir metot olarak memeli spermatozoonlarında kullanılmaktadır. Sıvı azota bağımsız ve farklı sıcaklıklarda (+25°C, +4°C, -20°C, -80°C) daha ekonomik saklama imkânı sağlayan bu metodu, gelecekte ıslah çalışmalarında ve genetik çeşitliliği korumak amacıyla gen bankalarında kullanılması birçok araştırmacı tarafından öngörülmektedir [27]. 1949 yılında Polge'nin sperma sulandırıcısına tesa-düfen ilave ettiği gliserol ile başlayan spermatozoon kriyoprezervasyonu, günümüzde herkes tarafından kullanılabilen, saha şartlarına uygun bir protokole uyarlanmıştır [44]. Liyofilizasyon çalışmalarındaki basınç ve liyofilizasyon sürelerinin farklılığı, kriyoprezervasyon metodu gibi bilim insanları tarafından kabul gören ortak bir liyofilizasyon protokolünün olmadığına göstergesidir. Bu durum hayvan türlerine özgü, farklı yöntemler ve liyoprotektanlar adını verebileceğimiz, liyofilizasyonun spermatozoon üzerindeki olumsuz etkilerini, elemine edebilecek maddeler ile liyofilizasyon protokollerinin optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir. Hızla gelişen teknoloji ve bilimsel çalışmaların ışığında, liyofilize spermatozoon metodunun, gelecek yıllarda hayvancılık endüstrisinde ve gen bankalarında, rutin yardımcı üreme tekniklerinden birisi olarak kullanılması, mümkün kılınabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Abdalla H, Hirabayashi M, Hochi S (2009): The ability of freeze-dried bull spermatozoa to induce calcium oscillations and resumption of meiosis. *Theriogenology*, 71(3): 543-52.
- Adams GDJ, Cook I, Ward KR (2015): The principles of freeze-drying. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Ed.: Wolkers WF, Oldenof H, s:121-143.
- Akın AO (2017): Çiftlik Hayvanları genetik kaynaklarının korunması ve sürdürülebilir kullanımı küresel stratejilerinin ve Türkiye örneğinin değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ak K, Cirit Ü, Sandal Aİ, Arıcı R, Özmen MF (2017): Dondurulmuş Spermanın Depolanması ve Kullanımında Saha Koşullarında Yapılan Hatalı Uygulamalar ve Çözüm Önerileri. *Türkiye Klinikleri Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 3(1): 44-59.
- Anzalone DA, Palazzese L, Iuso D, Martino G, Loi P (2018): Freeze-dried spermatozoa: An alternative biobanking option for endangered species. *Animal Reproduction Science*, 190: 85-93.
- Arav A, Saragusty J (2016): Directional freezing of sperm and associated derived technologies. *Animal Reproduction Science*, 169: 6-13.
- Benedict M (1905): The determination of water in foods and physiological preparations. *Ann J Physiol*, 13: 309-329.
- Bialy G, Smith VR (1957): Freeze-drying of bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 40: 739-745.
- Billy D, Potts M (2001): Life and death of dry prokaryotes. *Res Microbiol*, 153: 7-12.
- Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) (2012): Cryoconservation of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12*. Rome.
- Choi YH, Varner D, Love CC, Hartman DL, Hinrichs K (2011): Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction*, 142: 529-538.
- Derjick AA, Heijden GW, Giele M, Philippens ME, Van Bayel CC, Boer P (2006): Gamma H2AX signaling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote. *DNA Repair* 5: 959-971.
- Ergün Z (2015). Biyolojik maddelerin kurutulmuş saklanması: liyofilizasyon. *Etilik Vet Mikrobiyoloji Dergisi*, 26(1): 35-40.
- Flosdorf EW, Mudd S (1935): Procedure and apparatus for preservation in "lyophile" form of serum and other biological substances. *The J. of Immunology*, 29(5): 389-425.
- Flosdorf EW, Kimball AC (1939): Studies with H. Pertussis: Maintenance of Cultures in Phase I. *J Bacteriol* 35: 696-704.
- Gianaroli L, Magli MC, Stanghellini I, Crippa A, Crivello B, Pescatori ES, Ferraretti AP (2012): DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertility and sterility*, 97(5): 1067-1073.
- 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.
- Hara H, Tagiri M, Hwang IS, Takahashi M, Hirabayashi M, Hochi S (2014): Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. *Cryobiology*, 68(3): 354-360.
- Harrouk W, Codrington A, Vinson R, Robaire B, Hales BF (2000): Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. *Mutation Research*, 461: 229-241.
- Hochi S, Abdalla H, Hara H, Hirabayashi M (2011): Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 57(5): 557-563.
- Jaroudi S, Kakourou G, Cawood S, Doshi A, Ranieri DM, Serhal P (2009): Expression profiling of DNA repair genes in human oocytes and blastocysts using microarrays. *Human Reproduction*, 24: 2649-2655.
- Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R (2003a): Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biology of reproduction*, 68(1): 136-139.
- Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW, Yanagimachi R (2003b): Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulphidylized status. *Biology of reproduction*, 69(6): 1859-1862.
- Kaneko T, Nakagata N (2006): Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology*, 53(2): 279-282.
- Kaneko T, Serikawa T (2012): Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. *Cryobiology*, 64(3): 211-214.
- Kaneko T, Ito H, Sakamoto H, Onuma M, Inoue-Murayama M (2014): Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PLoS one*, 9(11): e113381.
- 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.

28. Kawase Y, Araya H, Kamada N, Jishage K, Suzuki H (2005): Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biology of reproduction*, 72(3): 568-573.
29. Keskindepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, Norris K, Curuk MA, Khan I, Brackett BG (2002): Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67(2): 409-415.
30. Keskindepe L, Eroğlu A (2015): Freeze-drying of Mammalian Sperm. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Ed.: Wolkers WF, Oldenof H, p:489-497.
31. Krokida MK, Karathanos VT, Maroulis ZB (1998): Effect of freeze-drying conditions on shrinkage and porosity of dehydrated agricultural products. *Journal of Food Engineering*, 35(4): 369-380.
32. Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y (2007): Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Human Reproduction*, 23(2): 233-239.
33. Kwon IK, Park KE, Niwa, K (2004): Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71(5): 1430-1436.
34. Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Yang X (2004): Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biology of Reproduction*, 70(6): 1776-1781.
35. Lopez-fernandez C, Fernandez JL, Gosalbez A, Arroyo F, Vazquez JM, Holt WV, Gosalvez J (2008): Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: Ram. *Theriogenology*, 70(6): 898-908.
36. Malik A, Laily M, Zakir MI (2015): Effects of long term storage of semen in liquid nitrogen on the viability, motility and abnormality of frozen thawed Frisian Holstein bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1): 22-25.
37. Men NT, Kikuchi K, Furusawa T, Dang-Nguyen TQ, Nakai M, Fukuda A, Tajima A (2016): Expression of DNA repair genes in porcine oocytes before and after fertilization by ICSI using freeze-dried sperm. *Animal Science Journal*, 87(11): 1325-1333.
38. Morishita N, Ochi M, Horiuchi T (2019): Development of golden hamster embryos effectively produced by injection of sperm heads sonicated in Tris-HCl buffer with EGTA. *Reproductive Medicine and Biology*, 18(1): 83-90.
39. Nireeaha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Babu MN, Lavakumar V (2013): Lyophilization/freezing—an review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(4): 87-98.
40. Nur Z, Birlir S, Üstüner B, Zık B, Özdaş ÖB, Akkoç CÖ (2009-2012). Koç spermalarının liyofilizasyonu ve intra-stoplazmik sperm enjeksiyonu yöntemi ile embriyo üretimi. (Yayınlanmamış veriler) TÜBİTAK Projesi, TEBAĞ 108R018.
41. Olaciregui M, Luño V, Gonzalez N, De Blas I, Gil L (2015): Freeze-dried dog sperm: Dynamics of DNA integrity. *Cryobiology*, 71(2): 286-290.
42. Olaciregui M, Luño V, Martí JI, Aramayona J, Gil L (2016): Freeze-dried stallion spermatozoa: evaluation of two chelating agents and comparative analysis of three sperm DNA damage assays. *Andrologia*, 48(9): 988-994.
43. Olaciregui M, Luño V, Domingo P, González N, Gil L (2017): In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. *Scientific Reports*, 7(1): 1096.
44. Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172): 666.
45. Ringleb J, Waurich R, Wibbelt G, Streich WJ, Jewgenow K (2011): Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(6): 818.
46. Shackell LF (1909): An improved method of desiccation, with some applications to biological problems. *Ann J Physiol* 20: 325-340.
47. Shahba MI, El-Sheshtawy RI, El-Azab AS, Abdel-Ghaffar AE, Ziada MS, Zaky AA (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.
48. Sherman JK (1954): Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. *Fertility and sterility*, 5(4): 357-371.
49. Şen U (2013): Liyofilize spermanın in vitro embriyo üretiminde kullanımı. 8. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, 5-7 Eylül, Bildiri Kitabı, s:183-188.
50. Wakayama T, Yanagimachi R (1998): Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature Biotechnology*, 16(7): 639-641.
41. Wossidlo M, Arand J, Sebastiano V, Lepikhov K, Boiani M, Reinhardt R, Walter J (2010): Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *The EMBO journal*, 29(11): 1877-1888.
52. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*, Knobil E, Neill JD, Eds.: Raven Press, p:189-317.
53. Yavaş İ, Cantekin Z, Korkmaz Yavaş T (2013): Sıvı azot ile yapılan kryopreservasyon tekniklerinde mikrobiyal kontaminasyon riskleri ve çözüm önerileri. *Lalahan Hay. Arşt. Enst. Derg.* 53(1): 39-45
54. Yöney T (2005): Gıdaları dondurarak kurutup saklamak nasıl çalışır? *Bilim teknik dergisi*, 12:101.

