

Goat Sperm Vitrification

Çiğdem ÇEBİ^{1*}, Ricardo FAUNDEZ²

¹Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Harran Kocatepe University, Sanliurfa, Türkiye

² InviMed Fertility Clinics, 02-532 Warsaw, Poland

ABSTRACT

The vitrification method is a freezing method in which the cooling rate is very high and high concentration permeable cryoprotectants are used. The vitrification method, which has a wide application area in embryo freezing, was applied to the storage of goat semen and the effect of the vitrification method on semen quality was determined. For this purpose, semen samples taken from 4 healthy goats via artificial vagina were divided into 4 equal groups. While the semen samples in Group 1 were frozen with the conventional method with Tris-sitrate modified solution containing 20% egg yolk and 5% glycerol, the remaining sperm samples were frozen with 0.1 M (Group II), 0.25 M (Group III) and 0.5 M (Group IV) was diluted with Human Tubal Fluid diluent containing sucrose and vitrification method was applied. Standard semen analysis (spermatozoa motility, plasma membrane integrity, sperm morphology, chromatin integrity) was performed on all semen samples after conventional freezing and vitrification. As a result, attempts to vitrify goat spermatozoa using non-permeable cryoprotectants have resulted in very low viability. The physical and chemical changes occurring during vitrification negatively affected the motility, viability and sperm morphology of spermatozoa.

Key Words: Goat, Semen, Sucrose, Vitrification

Teke Spermasının Vitrifikasyonu

ÖZ

Vitrifikasyon metodu, soğutma hızının çok yüksek olduğu, yüksek konsantrasyonlu permeable kriyoprotektanların kullanıldığı bir dondurma yöntemidir. Embriyo dondurulmasında oldukça geniş uygulama alanı bulan vitrifikasyon methodunun teke spermasının saklanması için uygulanarak sperma kalitesi üzerine vitrifikasyon methodunun etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla 4 sağlıklı tekedan suni vajen yoluyla alınan sperma örnekleri 4 eşit gruba ayrılmıştır. Grup 1'deki sperma örnekleri %20 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren Tris-Sitrat modifiye solüsyonu ile konvansiyonel metotla dondurulurken, geri kalan sperma örnekleri ise 0.1 M (Grup 2), 0.25 M (Grup 3) ve 0.5 M (Grup 4) sükröz içeren Human Tubal Fluid sulandırıcısı ile sulandırılıp vitrifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Tüm sperma örneklerinde konvansiyonel dondurma ve vitrifikasyon işlemi sonrası standart sperma analizi (spermatozoa motilitesi, plasma membran bütünlüğü, spermatozoa morfolojisi, kromatin bütünlüğü) yapılmıştır. Sonuç olarak, non-permeable kriyoprotektanlar kullanılarak teke spermatozoasını vitrikiye etmek için girişilen deneyimler çok düşük canlılıkla sonuçlanmıştır. Vitrifikasyon sırasında oluşan fiziksel ve kimyasal değişiklikler, spermatozoanın motilitesini, canlılığını, spermatozoa morfolojisini olumsuz şekilde etkilemiştir.

Anahtar Kelimeler: Sperma, Sükröz, Teke, Vitrifikasyon

To cite this article: Çebi Ç, Faundez R. Goat Sperm Vitrification. Kocatepe Vet J. (2023):16(4): 521-529

Submission: 20.09.2023 Accepted: 21.11.2023 Published Online: 11.12.2023

ORCID ID; CC: 0000-0001-6876-2069, RF: 0000-0002-5171-4615

*Corresponding author e-mail: cigdemcebi@harran.edu.tr

GİRİŞ

Reproduksiyon teknolojisinden bağımsız olarak, kriyobiyoloji teknolojisi, yirminci yüz yılın başlarından beri gelişmektedir. Bilindiği gibi kriyoprezervasyon işlemindeki amaç, çok düşük bir sıcaklıkta canlı bir hücre veya dokunun minimum hasarla fonksiyon kaybı oluşturmaksızın uzun süreli saklanmasıdır (Tunalı 2014). Keçilerde dondurulmuş sperma ile yapılan suni tohumlamalardan elde edilen fertilitate oranı büyükbaş hayvanlarda yapılan suni tohumlamalara oranla daha düşüktür. Bunun nedenlerinden biri de kullanılan sperma dondurma tekniklerinin yeterince geliştirilememiş olması olabilir (Kulaksız ve Daşkın 2009). Konvansiyonel kriyoprezervasyon tekniği küçükbaş hayvan spermasının saklanması kapsamlı bir şekilde uygulanmakta olsa da yavaş dondurma sırasında hücre içi veya hücre dışı buz kristali oluşumu ve ozmotik değişikliklerin meydana gelebileceği, bunun da aşırı hücre büzülmesine ve spermatozoa hasarına yol açtığı bilinmektedir (Jiménez-Rabadán ve ark 2015). Hücre içi buz kristali oluşumunun, dondurma sırasında spermatozoa hücresinde meydana gelen ana hasarın nedenlerinden biri olduğu ve suni tohumlamadan sonra üreme etkinliğini azalttığı iyi bilinmektedir. Ayrıca konvansiyonel dondurmada, lipit faz geçişindeki değişiklikler sonucu reaktif oksijen türlerinin üretimi ile lipit peroksidasyonundaki artışa bağlı olarak hareketli spermlerin hız ve yüzdesinde azalma ve fertilizasyon potansiyelinde önemli kayıplar meydana geldiği de rapor edilmiştir (Barbosa ve ark. 2023; Gharajelar ve ark. 2016). Konvansiyonel yavaş dondurmaya alternatif olarak doku veya organlarda buz kristal oluşumunu engellemek için yüksek kriyoprotektan konsantrasyonu gerektiren vitrifikasyon metodu geliştirilmiştir (Jiménez-Rabadán ve ark. 2015). Geleneksel dondurma işlemlerinden farklı olarak vitrifikasyon metodu yüksek kriyoprotektan konsantrasyonu ile hızlı dondurma/çözdürme hızını içerir ve bu iki faktörün kombinasyonu ile viskozitesi hızla artan bir solusyon içerisinde buz kristali oluşumu olmadan sulu çözeltilerin sıvı halden camsı hale doğrudan geçişini içerir (Mukaida ve ark. 1998; Vajta ve Nagy 2006). Buz kristal oluşumunu engellemesi yanında ayrıca maliyetinin az olması, kısa sürede ve kolay uygulanabilir olması ile memeli embriyo dondurulmasında vitrifikasyon methodu oldukça geniş uygulama alanı bulmuştur ve başarıyla kullanılmaktadır. Ancak embriyo vitrifikasyon prosedürünün spermatozoa kriyoprezervasyonunda doğrudan kullanımı, spermatozoanın toksik ve ozmotik strese karşı yüksek duyarlılığı nedeniyle uygun değildir (Le ve ark. 2019). Ayrıca, embriyo çok hücreli bir yapıya sahiptir ve bu nedenle, embriyodaki bazı hücreler kriyohasar nedeniyle hasar görse bile, kalan canlı hücreler yine de bu ölü hücrelerin yerini almak için çoğalabilirler. Spermatozoa ise transkripsiyon ve translyasyon kabiliyetine sahip

olmayan tek hücredir ve bu nedenle kriyohasardan kurtulamaz (Lv ve ark. 2019). Vitrifikasyon yönteminde ise yavaş kademeli soğutma yönteminden farklı olarak yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan ajanlar kullanılmakta (4-8 mol/l), seeding ve yavaş soğutma işlemi olmadan hücreler çok hızlı bir şekilde (15.000-30.000°C/dk) soğutulmaktadır (Fahy ve Rall 2007). Bu nedenle yüksek kriyoprotektan konsantrasyonunun spermatozoa hücreleri üzerine toksik etkisinden dolayı, vitrifikasyon metodunun erkek gametlerin dondurularak saklanması için uygun bir method olmadığı görüşü uzun yıllardır popülerdi (Lv ve ark. 2019; Sánchez ve ark. 2011). Aslında, spermatozoanın vitrifikasyonu yeni bir kavram olmamakla beraber spermanın başarılı şekilde ilk vitrifiye edilmesi 1938 yılında kurbağalarda gerçekleştirilmiştir. Fakat soğutmanın kritik hızından dolayı memeli spermasını vitrifiye etmek için girişilen ilk deneyimler ya düşük ya da sıfır canlılıkla sonuçlanmıştır (Isachenko ve ark. 2012; Lv ve ark. 2019; Sánchez ve ark. 2011). Hücreleri çevreleyen medyum viskozitesi artırılarak, hücre içi ve hücre dışı kristal oluşumunu engellemek için karbonhidrat, protein ve diğer ekstraselüler ajanlar kullanılarak ve soğutma oranı artırılarak solusyonlardan permeabl kriyoprotektanlar uzaklaştırıldıktan sonra insan spermasının vitrifiye edilmesinden sonra elde edilen sonuçlardan dolayı son çalışmalarda bu durum tersine dönmüştür (Isachenko ve ark. 2012; Lv ve ark. 2019; Sánchez ve ark. 2011). Kriyoprotektanlar materyalin donma noktasını azaltarak buz kristal oluşumundan ya da donma hasarından spermatozoayı korumak için hizmet eden düşük molekül ağırlıklı kimyasallardır (Wetzels ve ark. 1996). Plazma membranlarına penetre olma yeteneklerine göre iki çeşit kriyoprotektan vardır ve hücrelerin çoğu kriyoprotektan ajanlar kullanılmaksızın canlı kalmaz. Dimetilasetamid, dimetilsülfoksit, gliserol, glikol, etilen ve methanol gibi permeabl olan kriyoprotektanlar hücre membranı proteinini stabilize ederek elektrolitlerin konsantrasyonunu azaltırlarken, albümin, dekstran, polietilen glikol, polivinilprolidone ve sükroz gibi non-permeabl kriyoprotektanlar ise, dondurma sırasında suyun hücre içinden hücre dışı ortama geçişini uyararak buz kristallerinin oluşumunu minimize ederek dış ortamın ozmolaritesinde bir artışa neden olarak destekleyici rol oynarlar (Barbosa ve ark. 2023). Isachenko ve ark. (2008) 30 µl insan sperma damlacıklarını (30 µl) insan tubal sıvısı, %1 insan serumu ve non-permeabl kriyoprotektan olan 0.25 M sükroz ile seyreltilmesi sonrası vitrifiye edilen spermatozoonların çözdürme sonrası hayatta kaldığını buldu. Daha sonra balık spermasında da benzer sonuçlar rapor edildi (Merino ve ark. 2011). Bu çalışmalar sperma vitrifikasyonunun mümkün olabileceğini ima eden anlamlı ve cesaret verici çalışmalardı (Lv ve ark. 2019). Sükrozun vitrifikasyon işlemi sırasında hücresel strese karşı ozmotik bir tampon görevi gören potansiyel bir kriyoprotektan olduğu ve kriyohasaratları azalttığı bir çok çalışmada

rapor edilmiştir (Shah ve ark. 2019; Zakošek ve ark. 2020). Fakat spesifik olarak tekeler için, spermayı muhafaza etmek için alternatif yöntemlerin kullanımına ilişkin çok az bilgi mevcuttur. Bu amaçla, çalışmamızda non-permeabl bir kriyoprotektan olan sükrözün farklı dozlarının spermaya eklenmesi ile teke spermasının vitrifikasyonu sağlanarak sperma kalitesi üzerine vitrifikasyon prosedürünün etkisi belirlenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi araştırma uygulama çiftliğinde bakım beslemesi yapılan 4 adet teke kullanıldı. Çalışma için, 19.02.2015 tarih 2015/02 sayılı izin belgesi, DOLLVET Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Tekelerden haftada iki kez olmak üzere suni vajen yöntemi ile sperma alındı ve sperma hacmini artırmak ve aralarındaki değişkenliği ortadan kaldırmak için her bir ejakulat her seferinde pooling yapıldı. Spermalar kullanılıncaya kadar 37°C'de su banyosunda bekletildi. Tekelerden suni vajen kullanılarak alınan sperma örneklerinde ejakulatların makroskobik ve mikroskobik değerlendirilmeleri (miktar, motilite, yoğunluk, anormal spermatozoa oranı, membran bütünlüğü) yapıldıktan sonra sperma parametreleri; %80'den fazla progresif motilite gösteren ve yoğunluğu 2.0×10^9 spermatozoa.ml⁻¹, membran bütünlüğü >%70, toplam anormal spermatozoa oranı <15 olan ejakulatlar çalışmada kullanıldı. Suni vajen yoluyla alınan sperma örnekleri 4 eşit gruba ayrıldı ve çalışma altı tekrardan oluşturuldu. Grup 1 (Kontrol grubu)'deki sperma örnekleri final konsantrasyonu yaklaşık 100×10^6 spermatozoa.ml⁻¹ olacak şekilde %20 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren Tris-Sitrat modifiye solüsyonu ile sulandırılıp 0.25 ml'lik payetlere çekilerek konvansiyonel metotla dondurma işlemi gerçekleştirildi (Ömür ve Çoyan 2014). Geri kalan sperma örnekleri ise deney gruplarını oluşturdu ve vitrifikasyon işlemine tabi tutuldu. Bu yöntem Isachenko ve arkadaşları (2012) tarafından belirlenen metoda göre yapıldı. Temel sulandırıcı olarak Human Tubal Fluid (HTF) solüsyonu kullanıldı. Vitrifikasyon işleminden önce sperma örnekleri, 0.1 M (Grup 2), 0.25 M (Grup 3) ve 0.5 M (Grup 4) farklı konsantrasyonlarda sükröz ve %1 Bovine Serum Albumin (BSA) içeren Human Tubal Fluid (HTF) sulandırıcısı (vitrifikasyon solüsyonu) ile 1:1 oranında sulandırıldı. Her bir sperm örneği santrifüj edildi ve final konsantrasyonu 2×10^6 spermatozoa.ml⁻¹ olacak şekilde yeniden aynı vitrifikasyon solüsyonu ile resüspanse edildi. Spermanın saklanması için 50 µl'lik (Gynemed GmbH, Lensahn, Germany) plastik kapillerler kullanıldı. Bu kapillerler 10 µL'lik sperm süspansiyonu ile dolduruldu. Aspirasyon işlemi tamamlandıktan sonra bu plastik kapillerler 0.25 ml'lik payetler içine yerleştirildi. Payetin iki ucu emin bir şekilde kapatıldıktan sonra direkt sıvı azot içerisine daldırıldı. Çözdürme işlemi yapılmadan önce en az 1

hafta sıvı azot içinde kalmaları sağlandı. Çözdürme işlemi ise, kapillerler 0.25 ml'lik payetlerden uzaklaştırıldı. Payetin üst ucu kapillerin ucuna yakın olabildiği kadar yakından steril bir makasla kesildi ve spermatozoa süspansiyonu sperma kalitesini değerlendirmek için kapillerden uzaklaştırıldı. Yaklaşık 20 saniye 37°C'de 0.7 ml vitrifikasyon medyumuna ile sulandırılıp santrifüj edildi ve çözdürülen payetlerden spermatozoa muayeneleri için örnekler alınıp incelendi. Konvansiyonel methodla dondurulan (Grup 1) sperma örnekleri ise 37°C'lik su banyosunda 30 saniye çözdürülerek payetlerden spermatozoa muayeneleri için örnekler alınıp incelendi.

Spermatozoa Parametreleri

Spermatozoa Motilitesi

Motilite muayenesi, ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskopta (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) yapıldı. Bu amaçla lam üzerine üç ayrı noktaya 5 µl sperma konup üzeri lamelle kapatıldı ve 20'lik objektifte yüzde oranı ile belirlendi.

Plasma Membran Bütünlüğü

Spermatozoon membrane bütünlüğü, çift filtreli fluoressan mikroskopu (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) ve Propidium iodide (PI)/SYBR-14 viability kiti (Invitrogen) kullanılarak belirlendi. Bunun için ependorf tüplerine final konsantrasyonu 1.5×10^6 .ml⁻¹ sperma konup üzerine 5 µl SYBR-14 eklenerek 10 dakika bekletildi. Ardından üzerine 5 µl PI eklenip tekrar 10 dakika bekletildi. Bu süre sonunda 3 µl örnek lam üzerine konup üzeri lamel kapatılarak 100 spermatozoa sayıldı. PI ile boyanıp ve kırmızı fluoressan yayanlar ölü, SYBR-14 ile boyanan ve yeşil fluoressan renk verenler canlı olarak kabul edildi (Cebi Sen ve ark. 2018).

Spermatozoa Morfolojisi

Spermatozoa morfolojisinin değerlendirilmesinde SpermBlue boyama metodu kullanıldı. 10 µl sperma örneğinden smear yapılarak havada kurutuldu. Smear vertikal olarak SpermBlue fiksatifinin içine daldırıldı ve oda ısısında 10 dakika bekletildi ve 10-12 dakika kadar da SpermBlue boyasına daldırıldı. Aşırı boyamanın alınmasını önlemek için 3 saniye içinde distile suya batırılıp preparatlar havada kurutulduktan sonra immersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskobunda X400 büyütmede değerlendirildi. Spermatozoa defeklerinin yüzdesi en az 100-300 spermatozoa sayılarak belirlendi (Van der Horst ve Maree 2009).

Spermatozoon Kromatin Ayrılma Testi (Halosperm Test)

Spermatozoon DNA fragmentasyonun değerlendirilmesi in vitro diagnostik kit olan halomax (DNA Halotech SL (Halomax, Spain) kitinin protokülüne göre uygulanarak yapıldı. Spermayı lam üzerine fikse etmek için agaroz mikro jel önce 5 dk

90°C-100°C daha sonra ise 37°C'deki su banyosunda 5 dk bekletilerek 25 µl sperma örneği ilave edilerek karıştırıldı. Karışımından 15-20 µL'lik bir örnek slayt üzerine konuldu ve içindeki agarı katılaştırmak için +4 derecede 5 dakika buzdolabında bekletildi. Asit denaturasyon solüsyonunu hazırlamak için 10 ml distile suya 80 µL denatüre edici solüsyon eklendi. Slayt buzdolabından çıkarılarak yatay konumda denatüre edici solüsyonda 7 dakika ardından da 10 ml lizis solüsyonunda 25 dakika inkübasyona bırakıldı. Lizis solüsyonundan arındırmak için slayt distile suda 5 dakika boyunca bekletildi. Sonra sırasıyla %70, %90 ve %100'lık etil alkol solüsyonlarında ikişer dakika bekletilip oda ısısında kurutularak Diff-Quik boyası ile boyandı. Slaytlarda floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskop kullanılarak 100 spermatozoa sayıldı. Spermatozoon nükleusu etrafında oluşan halonun genişliği ölçülerek spermatozoon DNA'sının hasarlı olup olmadığı değerlendirildi. Spermatozoon etrafında büyük halo oluşumu DNA fragmentasyonu için negatif olarak değerlendirilken, hiç halo olmaması ya da küçük bir halo gözükmesi DNA fragmentasyonu için pozitif olarak değerlendirildi (Cebi Sen ve ark. 2018).

İstatistik

İstatistiksel analizler 'SPSS statistic 26 paket programı' ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama standart sapma olarak gösterilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde nonparametrik Kruskal Wallis H testi kullanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde $p < 0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklı konsantrasyonlarda (0.1 M, 0.25 M ve 0.5 M)

sükroz içeren deneme gruplarındaki spermatozoa motilitesindeki azalma kontrol grubuna göre (%65,83±3,8) önemli derecede azalmıştır ($p < 0,010$). Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'deki spermatozoa motilitesindeki azalma benzer özellik göstermekte olup, aralarında istatistiksel fark yoktur. Membran bütünlüğü gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermiştir ($p < ,001$). Kontrol grubu (%70±1,4) ile karşılaştırıldığında, farklı sükroz konsantrasyonuna bağlı olarak en düşük plazma membran bütünlüğü Grupta 2 (%2,0±,0)'de elde edilirken, en yüksek plazma membran bütünlüğü Grupta 3 (%3,50±,6)'de elde edilmiştir. Grup 4 ise, Grup 2 ve Grup 3 ile benzerlik göstermiştir (Tablo 1). Kontrol grubu (%20±,0) ile vitrifikasyon grupları karşılaştırıldığında tüm gruplardaki spermatozoa morfolojisindeki farklılıklar önemli bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda anormal spermatozoa oranı tüm gruplarda artmıştır. 0.1 M (Grup 2) sükroz eklenmesi sonucu anormal spermatozoa oranı (%54,67±4,1) diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. 0.25 M (Grup 3) sükroz eklenen grupta anormal spermatozoa oranı %34,0±2 iken, 0.5 M (Grup 4) sükroz eklenen grupta %42,17±3,4 olarak bulunmuştur. Grup 4'ün anormal spermatozoa oranı Grup 3'ten ve Grup 2'den yüksek bulunmuştur ($p < ,001$).

Spermatozoa DNA fragmentasyon oranı bulguları gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermiştir ($p < ,027$). Grup 1 ve Grup 3'ün DNA fragmentasyon oranı benzer olmakla beraber sırası ile %4,67±1,9 ile %4,50±,6 olarak bulunmuştur. Grup 2'nin DNA fragmentasyon oranı %3,67±,8 olarak en düşük bulunurken, Grup 4'de 0.5 M sükroz eklenen grupta %5,83±,8 ile en yüksek değer bulunmuştur.

Tablo 1. Gruplara göre sperm parametrelerinin karşılaştırılması

Table 1. Comparison of sperm parameters according to groups

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Test/p
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Motilite	^a 65,83±3,8	^b 1±,0	^b 2,17±,4	^b 1,5±,6	KW:19,965 p:;000
Membran bütünlüğü	^a 70±1,4	^c 2±,0	^b 3,50±,6	^{bc} 2,50±,6	KW:20,168 p:;000
Morfoloji	^d 20±,0	^a 54,67±4,1	^c 34±2	^b 42,17±3,4	KW:22,060 p:;000
DNA fragmentasyon oranı	^{ab} 4,67±1,9	^b 3,67±,8	^{ab} 4,50±,6	^a 5,83±,8	KW:9,155 p:;027

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterilmiştir (n=4). Aynı satırdaki farklı üst simgeler arasında fark vardır. Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır ($p < 0,0125$ anlamlı kabul edilmiştir).

Results are shown as mean±standard deviation (n=4). There is a difference between different superscripts on the same line. Bonferroni correction was made ($p < 0,0125$ was considered statistically significant).

TARTIŞMA

Bu çalışmada teke spermasını vitrifiye etmek için non-permeabl bir kriyoprotektan olan sükrözün farklı dozları kullanılarak sperma kalitesi üzerine etkisi belirlendi. Kriyo yöntemlerin etkinliğinin, permeable ve permeable olmayan kriyoprotektanların kullanımı ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Sánchez ve ark. 2011). Embriyo ve oosit dondurulmasında kullanılan standart vitrifikasyon tekniğinde yüksek konsantrasyonlu permeable kriyopektanların zararlı osmotik etkilerinden dolayı, direk olarak memeli spermasını başarı ile dondurmak olası olmadığından, permeable kriyoprotektanlar olmadan spermanın sıvı nitrojene doğrudan daldırılmasıyla spermanın vitrifikasyonu sağlanmıştır (Isachenko ve ark. 2004b). Bu amaçla yumurta sarısı veya permeable kriyoprotektanlar kullanılmadan non-permeable kriyoprotektan olarak proteinler ve şekerler kullanılarak spermanın vitrifikasyonu yapılabileceği rapor edilmiştir (Jiménez-Rabadán ve ark. 2015). Böylelikle yeni gelişmekte olan bu method ile kriyohasarlardan hücrelerin korunmasına olanak sağlanarak, toksik olan permeabl kriyopektanların kullanımı azaltılabilecektir. Bu amaçla insan spermasının sıvı nitrojene doğrudan daldırılarak kriyoprezervasyon için glikoz, sükröz ve trehaloz kullanımı araştırılmış (Isachenko ve ark. 2004a; Liu ve ark. 2016; Schulz ve ark. 2006) ve istatistiksel olarak çözündürme sonrası en iyi spermatozoa motilitesi ve canlılığının sulandırıcıya sükröz eklenmesi ile elde edildiği rapor edilmiştir. Arandoa ve ark. (2017)'nin raporuna göre, sükrözün koç spermasını vitrifiye etmek için potansiyel bir kriyoprotektan görevi görebileceği ve kriyohasarlara azaltılabileceği rapor edilmiştir. Koshimoto ve Mazur (2002) ise üç farklı şekeri (monosakarit glikoz, disakkarit sükröz ve trisakkarit rafinoz) araştırmış ve dondurma/çözündürme sonrası kriyohasarlara karşı korumada şekerin türünden daha çok şekerin konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut olan bu veriler ışığında var olan bu çalışmada teke spermasını vitrifiye etmek için soğuk şokunu azaltmak amacı ile şeker kökenli non-permeable bir kriyoprotektan olan sükrözün üç farklı dozu kullanıldı. Küçükbaş hayvan spermasının vitrifikasyonu ile ilgili şu ana kadar sınırlı sayıda bilgi mevcuttur. Çalışmamızda vitrifiye teke spermasından elde edilen sperma kalitesi, konvansiyonel dondurma protokolü kullanılarak elde edilenden sperma kalitesinden oldukça düşük bulunmuştur. Sonuçlarımızın aksine Pradice ve ark. (2017) İber dağ keçisinde epididimal spermayı, Isachenko ve ark. (2004a, 2004b) ise permeable kriyoprotektanlar kullanmadan memeli spermasını başarılı bir şekilde vitrifiye etmeyi başarmışlardır. Pradice ve ark. (2017) ise 100 mM sükröz ekleyerek konvansiyonel ve vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan epididimal teke spermasından çözündürme sonrası konvansiyonel dondurma yönteminde %45,0±6,0 spermatozoa motilitesi elde ederlerken,

vitrifikasyon sonrası %33,9±6,2 olarak bildirmişlerdir. Vitrifiye teke spermasından elde ettikleri spermatozoa motilite değerleri var olan çalışmadan oldukça yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca bizim çalışmamızdan farklı olarak köpeklerden ve balıklardan elde edilen vitrifiye edilmiş spermalarla da tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir (Merino ve ark. 2011, Sánchez ve ark. 2011). Vitrifiye edilmiş köpek spermasından elde edilen spermatozoa motilitesi %42,5±2,3 olup var olan çalışmadan elde edilen değerlerden oldukça yüksektir (Sanchez ve ark. 2011). Ayrıca Isachenko ve ark. (2008) tarafından bildirilen değerlere (%45–%57 hareketlilik) benzer olarak, Merino ve ark. (2011) kriyoprotektanlar olmadan küre yöntemi kullanılarak vitrifiye edilen ve 37°C'de çözündürülen balık sperması numunelerinde maksimum %85,7 spermatozoa motilitesi elde etmişlerdir. Var olan çalışmada ise vitrifikasyon sonrası en yüksek motilite değeri %2,17±,4 olup 0.25 M sükröz eklendiğinde ulaşılmıştır. Vitrifiye çözündürülmüş teke numunelerinde elde edilen sperma motilitesi Arandoa ve ark. (2017) tarafından rapor edilenlerden daha düşük, Jiménez-Rabadán ve ark. (2015) tarafından rapor edilenlerden daha yüksek bulunmuştur. Arandoa ve ark. (2017) tarafından vitrifikasyon sonrası koç spermasında en yüksek motilite (%8,4) değerlerine %2 BSA ile sulandırılmış spermaya 0.4 M sükröz eklendiğinde ulaşılmıştır. Jiménez-Rabadán ve ark. (2015) ise gliserol ve sükröz içeren payetlerde vitrifiye edilen koç spermatozoasında %0±0,73 motilite bildirmişlerdir. Arraztoa ve ark. (2016) ise %4 dimethylformamide ve %4 gliserol kullanarak küre yöntemi ile vitrifiye edilen domuz spermasında vitrifikasyon sonrasında hareketli spermatozoa elde etmemişlerdir. Kriyoprotektan olarak hücresel strese karşı ozmotik bir tampon görevi gören sukroz kullanıldığında, sperm hücrelerinin hareketliliğinde belirgin bir azalma olmaktadır ve bu kadar düşük motilitenin nedeni hala bilinmemektedir. Disakkaritlerin varlığında glikoz taşınmasının engellendiği iyi bilinmektedir. Daha yüksek moleküler ağırlığa ve daha düşük geçirgenliğe sahip olan sükröz ve trehaloz gibi disakkaritlerin plazma zarlarını kolayca geçemedikleri göz önüne alındığında, bir enerji kaynağı olarak sınırlı kalabilmektedirler. Disakkarit içeren sulandırıcılardaki spermatozoa, glikoz veya fruktoz içeren sulandırıcılara göre, çözündürme sonrası hareketliliğini daha hızlı kaybettiğinden belki de monosakkaritler spermatozoa tarafından daha kolay metabolize edilebilmektedir (Caturra-Sanchez ve ark. 2018). Ayrıca vitrifikasyon işlemi sonrası sperm hücrelerinin hareketliliğindeki değişiklikler mitokondriyal membran potansiyelindeki değişikliklere bağlı olabilir (Barbosa ve ark. 2023). Spermatozoalar sperm membran bütünlüğüne sahip oldukları zaman motil ve canlı olarak kabul edilirler (Le ve ark. 2019). Plazma zarındaki yağ asitlerinin peroksidasyonu da sperm morfolojisini bozar ve sperm motilitesinde azalmaya yol açar (Tamburrino ve ark. 2023). Jiménez-Rabadán ve ark. (2015) ise

vitrikiye koç spermasında spermatoza canlılığını $0,24 \pm 2,95$ ile $1,29 \pm 2,95$ (ortalama \pm SE) arasında olduğunu bildirmişlerdir. Arraztoa ve ark. (2016) tarafından da dimetilsulfoksit ile vitrikiye edilen domuz spermatozoasında çözüm sonu canlılık oranı %0-2 arasında olup benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da vitrikiye edilen teke spermasındaki başarı oranı çok düşük olmakla beraber en iyi sonuç kriyopektan olarak 0.25 M sükröz çözeltisi kullanıldığında elde edilmiştir. Vitrikiye çözdürülmüş teke spermasından elde edilen spermatozoa canlılığı Jiménez-Rabadán ve ark. (2015) ve Arraztoa ve ark. (2016) tarafından rapor edilenlerle benzerlik göstermekle beraber, Sanchez ve ark. (2011) ise köpek spermasının vitrifikasyon için farklı konsantrasyonlarda (0.1 M, 0.25 M ve 0.4 M) sükröz ilavesinden sonra spermatozoa canlılığı bakımından gruplar arası bir fark bulmamışlardır ve elde edilen değerler var olan çalışmadan oldukça yüksek bulunmuştur (Sanchez ve ark 2011). Bununla birlikte Araonda ve ark. (2017) sperma örneklerinin vitrifikasyon işleminden önce 2 saat kadar 5°C 'de tutulmasının sperm kalitesinin artırılmasına yardımcı olabileceğini rapor etmişlerdir. Vitrifikasyon işlemi öncesinde soğutulmuş sperma örneklerine kriyopektan olarak 0.6 M sükröz çözeltisi kullandıklarında, gruplar arasında sperm membran bütünlüğü bakımından önemli ($p \leq 0,05$) bir fark bulunurken, elde edilen değerler var olan çalışmadan yüksek bulunmuştur. Bu bağlamda hiperozmotik solüsyonlara (vitrifikasyonda kullanılan benzer) maruz bırakılan spermanın, düşük sıcaklıklarda muhafaza edildiğinde daha az spermolize uğrayabileceği ileri sürülmüştür (Gao ve ark. 1993). Olamitibo ve ark. (2016) ise farklı tris bazlı sulandırıcılara %20 oranında avokado çekirdeği ekstratının katılması ile vitrikiye edilen Batı Afrika Cücesi tekelerinden elde edilen spermatozoa kalitesini suni tohumlama programı için tatmin edici olduğunu rapor etmişlerdir. Spermatozoa motilitesi %35'den fazla elde edilirken spermatozoa canlılığı ise %55'ten yukarı değerler bulunmuş olup, elde edilen değerler var olan çalışmanın bulgularından oldukça yüksek bulunmuştur. Yazarlar avokado içeriğinin hücre fonksiyonlarında gerekli olan bazı mineralleri, lutein ve antioksidanları içermesinden dolayı vitrifasyondan başarılı sonuçlar aldıklarını ileri sürmüşlerdir (Olamitibo ve ark. 2016). Tavşan (Rosato ve ark. 2013) ve kanguru (McClean ve ark. 2008) spermaları da vitrikiye edilmeye çalışılmış ancak çözdürme sonrası çok az sayıda hareketli ve canlı hücre tespit edilmiştir. Ayrıca var olan çalışmada Jiménez-Rabadán ve ark. (2015)'nin belirttiği gibi sperm morfolojisi de vitrifikasyon işleminden negatif etkilenmiştir. Vitrifikasyon sonrası en yüksek sperm morfolojisi 0.1 M sukroz eklenmesi ile elde edilirken en iyi sonuç 0.25 M sükröz elde edilmesi ile bulunmuştur. Arandoa ve ark. (2017) ise farklı sükröz dozlarının eklenmesi ile vitrifikasyon sonrası gruplar arasında morfolojisi bakımından herhangi bir fark tespit etmemişlerdir.

Çalışmalar arası elde edilen spermatolojik farklılıklar vitrifikasyon için kullanılan kriyopektanlara özgü ozmotik değişikliklerle açıklanabilir (Agha-Rahimi ve ark. 2014). Ayrıca vitrifikasyondaki başarı, yukarıda bahsedilen bulgular eşliğinde vitrifikasyona karşı spermatozoa duyarlılığının olması türe bağlı olabilir ve spermatozoon başının boyutu veya şekli kriyodirençte rol oynayabilir (Arandoa ve ark. 2017). Spermatozoon başının şekli ve boyutu, hücrenin kriyosensivitesini tanımlayan faktörlerdendir. Bazı türlerde başın küçük boyutta olması daha yüksek kriyodirenç ile ilişkilendirilmiştir (Jiménez-Rabadán ve ark. 2015). Bu nedenle, insan spermatozoasının vitrifikasyona karşı daha yüksek kriyodirenci diğer türlere göre daha küçük ve yapısal olarak kompakt bir spermatozoon başına sahip olduğundan, teke, tavşan ve domuz gibi diğer memeli türlerinde görülen ultra hızlı soğumanın neden olduğu kriyohasara karşı daha az savunmasızdır (Arraztoa ve ark 2016; Isachenko ve ark 2004b; Nawroth ve ark. 2002). Olumlu sonuç alınmaması sadece spermatozoanın yapısal bileşimine değil aynı zamanda sperma alma yöntemi, vitrifikasyon prosedürünün soğutma ve çözdürme hızı gibi dikkate alınmayan diğer faktörlerden de kaynaklanıyor olabilir (Rosato ve Iaffaldano ark. 2013). Hücre dışı buz oluşumunun olmamasının koşulu yüksek hızdır, ancak ortamın yüksek viskozitesi ve non-permeable kriyoprotektanların optimal konsantrasyonu da başarılı vitrifikasyon için önemli bir faktördür (Agha-Rahimi ve ark. 2014; Barbosa ve ark. 2023). Soğutma ve çözdürme oranları, sperm kriyohasara boyutunu belirlemede kritik faktörlerdir (Agha-Rahimi ve ark. 2014). Aslında, soğutma ve çözdürme işlemleri sırasındaki problem, hücrelerin soğutma sırasında iki kez ve çözdürme sırasında bir kez geçmek zorunda olduğu ara sıcaklık (-10 ila -60°C) ile yakından ilişkili olan öldürücülüktür. Spermatozoa için ölümcül olan ısı (-15 - -5) aralığı, vitrifikasyon metodu ile hızla geçildiğinden buz kristal oluşum şansını azaltırken, konvansiyonel dondurma yönteminde hücreler bu öldürücü ısıya dondurma ve çözdürme süresince iki kez maruz kalmaktadır (Antonov, A ve Ivanova 2023; Peirovi ve ark. 2007). Vitrifikasyon işleminde kriyoprotektan madde antifriz gibi etki ederek donma ısısını düşürmektedir. Amaç soğutma esnasında giderek yükselen viskozite artışı ile buz çekirdeği oluşması ve büyümesinin önlenmesidir (Kervancıoğlu 2018). Yumurta sarısı ise genellikle sperma sulandırıcılarına permeable olmayan kriyokoruyucu olarak dahil edilmektedir (Zakošek ve ark. 2020). Maxwell ve Jonhson (1997) yumurta sarısının sulandırılmış spermatozoaya katılarak bir miktar koruma sağlayabileceğini bildirmiştir. Fakat teke spermasında bulunan seminal plazma ile yumurta sarısında bulunan fosfolipaz A enzimi arasındaki toksik etkileşim nedeniyle yumurta sarısının uzaklaştırılması gereklidir. Ayrıca yumurta sarısı kullanılmasını sınırlayan ve farklı araştırma grupları arasında farklı sonuçlara yol açan asıl nedenin yumurta sarısındaki tanımlanmamış bileşenlerin

olduğunun bilinmesidir. Ayrıca yumurta sarısı hayvansal kökenli olduğundan potansiyel bakteriyel kontaminasyonu ve hastalık bulaştırma riski olabileceğinden son yıllarda hayvansal kaynaklı kriyoprotektanların kullanımından kaçınmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Arandoa ve ark. 2017). Vitrifikasyon yönteminin getirdiği faydalardan biri de buz kristallerinin oluşumunu önlenmesi yanında yumurta sarısının ve gliserolün neden olduğu olumsuz etkilerden kaçınmaktır (Lv ve ark. 2019). Gliserol de spermatozoanın kriyotoleransını artırmasına rağmen, aynı zamanda spermatozoa üzerinde potansiyel toksik ve ozmotik stres üretir (Arandoa ve ark. 2017; Lv ve ark. 2019). Jiménez-Rabadán ve ark. (2015)'nin yaptığı bir çalışmada koç spermalarını vitrifiye etmek için 0.03 M sükröz-%3 gliserol ve 0.05 M sükröz-%7 gliserol kombinasyonlarına dayalı sulandırıcılara yumurta sarısının eklenmesi ile vitrifikasyon yöntemine spermatozoanın zayıf tolerans gösterdiğini belirterek olumlu sonuç alamamışlardır. Fakat sükrözün koç spermalarını vitrifiye etmek için potansiyel bir kriyoprotektan görevi görebileceğini rapor etmişlerdir. Domuzlarda da kriyoprotektan olarak gliserol kullanıldığında canlı hücre elde edilmemesine rağmen, gliserol kullanılması spermatozoanın DNA bütünlüğünü etkilememiştir. Rosato ve Iaffaldano (2013) tarafından tavşan spermalarının vitrifikasyonundan sonra sağlam DNA'ya sahip spermatozoa oranı ortalama $94,5 \pm 1,4$ olmakla beraber domuz spermalarının vitrifikasyonu sonucu elde edilen değerlere benzer sonuçlar rapor etmişlerdir. Elde edilen değerler Isachenko ve ark. (2004a,b), Jiménez-Rabadán ve ark. (2015) ve Arandoa ve ark. (2017)'nin bulguları ile de paralellik göstermiştir. Köpeklerde vitrifikasyon sulandırıcısına 0.25 M sükröz eklenmesi ile vitrifikasyon sonrası ($2,8 \pm 0,5$) spermatozoa DNA fragmentasyon oranı kontrole ($5,6 \pm 0,6$) göre önemli ölçüde azalmakla beraber daha düşük konsantrasyonlarda (0.1 M) veya daha yüksek konsantrasyonlarda (0.4 M) sükröz eklenmesinin vitrifikasyon sonrası DNA fragmentasyon oranını önemli ölçüde değiştirmemiştir. Satirapod ve ark (2012)'da vitrifikasyonun hızlı dondurmaya göre daha az spermatozoa DNA hasarına neden olduğu yönünde benzer sonuçlar bildirmişlerdir. Bu yazarlara göre, kriyoprezervasyon sonrası meydana gelen DNA hasarının buz kristali oluşumuna bağlı mekanik yaralanmalardan ve oksidatif stres bağlı olarak meydana geldiği bildirilmiştir (Agha-Rahimi ve ark 2014; Tamburrino ve ark. 2023). Var olan çalışmada da DNA fragmentasyon oranı en yüksek 0.5 M sükröz eklenmesi ile görülürken en düşük DNA fragmentasyon oranı 0.1 M sükröz eklenmesi ile elde edilmiştir. Birçok yazar, DNA hasarının, kullanılan kriyoprotektanların moleküler ağırlığı, yapısı, konsantrasyonu, kimyasal özellikleri ve kriyoprezervasyon protokolü ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir ve bu nedenle her sperma türü için en

iyi eşleşmeyi bulmak amacıyla farklı kombinasyonlar kullanılarak tekrar test edilmelidir (Arandoa ve ark. 2017).

SONUÇ

Vitrifiye edilen teke spermasından elde sonuçlardan suni tohumlamada kullanım için yetersiz değerler elde edilse de, non-permeable bir kriyoprotektan olan sükrözün DNA bütünlüğünü etkili bir şekilde koruyabilmesinden dolayı intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi teknolojik yöntemlerin kullanımı ile bu handikapın üstesinden gelinebilir. Vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuş spermanın canlılığı zayıf veya tamamen kaybolmuş olsa bile, ICSI performansı sırasında spermatozoa kuyruklu mikromanipulator ile kırıldığından dolayı ICSI'nin başarısı için spermatozoanın yapısal bütünlüğü kritik bir öneme sahip değildir. Bu nedenle, küçük ruminant spermasının vitrifikasyonu ile ilgili çalışmalar halen anlam taşımaktadır. Vitrifikasyondan sonra en iyi sperma kalitesini elde etmek amacıyla sperma vitrifikasyonu için en iyi kriyopektan maddeyi ve vitrifikasyon metodunun uygun yönetimini aydınlatmak için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest to report.

Authors' Contributions: CC and RF contributed to the project idea, design and execution of the study. CC and RF contributed to the acquisition of data. CC and RF analysed the data. CC and RF drafted and wrote the manuscript. CC and RF reviewed the manuscript critically. All authors have read and approved the finalized manuscript.

Ethical approval: This study was carried out at Harran University Reserch Animals Application Center. This research was approved by The Ethics Committee of Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretim Sanayi ve Ticaret A.Ş. (DOLLVET-HADYEK), (Tarih: 02/2015). This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees" 8 (k). The data, information and documents presented in this article were obtained within the framework of academic and ethical rules.

Acknowledgement: In this study would like to thank the Harran University Scientific Research Projects Coordinatorship (HÜBAP) with the study entitled "Teke spermalarının vitrifikasyonu", Project No: 1609, for their contributions to the present study and also thank the administration and staff of the Harran University Reserch Animals Application Center.

Explanation: We have no presented as a oral, poster, abstract vs.

KAYNAKLAR

- Agha-Rahimi, A., Khalili, M.A., Nabi, A., & Ashourzadeh S. (2014). Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. *Reprod. Biomed*, 26, 352-358.
- Antonov, A., & Ivanova, B. (2023). Canine sperm vitrification with nonpermeable cryoprotectants and coconut water extender. *Anim Reprod*, 23, 20(2), e20230004. doi: 10.1590/1984-3143-AR2023-0004.
- Arandoa, A., Gonzalezb, A., Delgado, J.V., Arrebolac, F.A., & Perez-Marín, C.C. (2017). Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science*, 181, 175-185. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.04.008.
- Arraztoa, C.C., Miragaya, M.H., Chaves, M.G., Trasorras, V.L., Gambarotta, M.C., & Neild, D.M. (2017). Porcine sperm vitrification II: Spheres method. *Andrologia*, 49(8), 1-8. https://doi: 10.1111/and.12738.
- Barbosa, B.B., Evangelista, I.T.A., Soares, A.R.B., Leão, D.L., Pereira, R.J.G., & Domingues, S.F.S. (2023). Kinetic vitrification: concepts and perspectives in animal sperm cryopreservation. *Anim Reprod*, 22, 20(2):e20220096. doi: 10.1590/1984-3143.
- Caturla-Sanchez, E., Sanchez-Calabuig, M., Perez-Gutierrez, J., Cerdeira, J., Castano, C., & Santiago-Moreno, J. (2018). Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Cryobiology*, 80, 126. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.11.001.
- Cebi Sen, C., Yumusak, N., Atilgan, H.I., Sadic, M., Koca, G., & Korkmaz, M. (2018). The protective effect of melatonin on sperm quality in rat after radioiodine treatment. *Andrologia*, 50, 1-7. https://doi: 10.1111/and.12962.
- Fahy, G.M., & Rall, W.F. (2007). Vitrification: an overview. In Tucker MJ, Liebermann J, eds. *Vitrification in Assisted Reproduction. A User's Manual and Troublr-Shooting Guide*. London: Informa Healthcare, 1-20.
- Gao, D.Y., Ashworth, E., Watson, S.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. *Biol Reprod*, 49, 112-123.
- Gharajelar, S.N., Sadrkhanloo, R.A., Onori, M., & Saberivand, A. (2016). A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine sperm during vitrification process. *Vet Res Forum*, 7(3), 235-239.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I.I., Montag, M., Dessole, S., Nawroth, F., & Van DerVen, H. (2004a). Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility DNA integrity, and fertilization ability. *Biol Reprod*, 71, 1167-1173.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I.I., Rahimi, G., Schondorf, T., Mallmann, P., Dessole, S., & Nawroth, F. (2004b). DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod*, 19, 932-939.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Weis, J.M., Kreienberg, R., Katkov, I.I., Schulz, M., Lulat, A.G.M.I., Risopatrón, M.J., & Sánchez, R. (2008). Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Soc Reprod Fertil*, 136, 167-173.
- Isachenko, V., Maettner, R., Petrunkina, A.M., Sterzik, K., Mallmann, P., Rahimi, G., Sanchez, R., Risopatrón, J., Damjanoski, I., & Isachenko, E. (2012). Vitrification of Human ICSI/IVF Spermatozoa Without Cryoprotectants: New Capillary Technology. *Journal of Andrology*, 33, 462-468.
- Jiménez-Rabadán, P., García-Álvarez, O., Vidal, A., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Ramón, M., Del Olmo, E., Fernández-Santos, R., Garde, J.J., & Soler, A.J. (2015). Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, 71, 85-90.
- Kervancıoğlu, G. (2018). Kanser Hastalarında Fertilitenin Korunmasında Kullanılan Kriyoprezervasyon Yöntemleri. *Tıp Fakültesi Klinikleri*, 1(2), 17-26.
- Koshimoto, C.H., & Mazur, P. (2002). Effects of cooling and warming rate to and from)70 °C, and effect of further cooling from)70 to)196°C on the motility of mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, 66, 1477-1484.
- Kulaksiz, R., & Daşkın, A. (2009). Farklı antioksidanlarla dondurulan Saanen teke spermasının in vitro ve in vitro değerlendirilmesi. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 56, 201-205.
- Le, M.T., Nguyen, T.T.T., Nguyen, T.T., Nguyen, V.T., Nguyen, T.T.A., Nguyen, V.Q.H., & Cao, N.T. (2019). Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 234, 14–20. doi:10.1016/j.ejogrb.2019.01.001
- Liu, J., Tanrikut, C., Wright, D.L., Lee, G.Y., Toner, M., Biggers, J.D., & Toth, T.L. (2016). Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant. *Cryobiology*, 73(2), 162-170.
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q., Quan, G. (2019). Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreservation And Biobanking*, 17(2), 171-182.
- Maxwell, W.M.C., Welch, G.R., & Johnson, L.A. (1997). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, 8, 1165-1178.
- McClellan, R., Holt, W.V., Zee, Y.P., Lisle, A., & Johnston, S.D. (2008). The effect of cryoprotectant on kangaroo sperm ultrastructure and mitochondrial function. *Cryobiology*, 57, 297-303.
- Merino, O., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Figueroa, E., Valdebenito, I., & Isachenko, V. (2011). Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Anim. Reprod. Sci*, 124, 125-131.
- Mukaida, T., Wada, S., Takahashi, K., Pedro, P.B., An, T.Z., & Kasai, M. (1998). Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell embryos. *Hum Reprod*, 2874-2879.
- Nawroth, F., Isachenko, V., Dessole, S., Rahimi, G., Farina, M., Vargiu, N., Mallmann, P., Dattena, M., Capobianco, G., Peters, D., Orth, I., & Isachenko, E. (2002). Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Lett*, 23, 93-102.
- Olamitibo, D.J., Dayo, O.O., Oladimeji, A.M., Mathew, A., Olajide, O., Emmanuel, O.O., Oluwafemi, A.E., Amidu, S.T., & Ayobami, I.O. (2016). Effects of avocado seed extract in different trisextenders on sperm and oxidative stress indices of vitrified goat spermatozoa. *Journal of agricultural sciences*, 61(4), 359-374.

- Ömür, A.D., & Çoyan, K. (2014).** Sezon İçi ve Sezon Dışında Koç Spermasının Dondurulmasında Antioksidanların Etkisi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 11(1), 37-42.
- Peirouvi, T., Farjah, G., Rad, J.S., & Novin, M.G. (2007).** Vitrification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 5(3),117-120.
- Pradiee J., Sanchez-Calabuig M.J., Castano C., O'Brien E., Estes M.C., Beltran-Brena P., Maillo V., Santiago-Moreno J., & Rizos D. (2017).** Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*, 108(2018), 314-320.
- Rosato M.P., & Iaffaldano N. (2013).** Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 73, 508-516.
- Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., & Isachenko, E. (2011).** Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia*, 43, 233-241.
- Satirapod, C., Treetampinich, C., Weerakiet, S., Wongkularb, A., Rattanasiri, S., & Choktanasiri, W. (2012).** Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: On motility, morphology, vitality and DNA integrity. *Andrologia*, 44, 786-790. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01267.x
- Schulz, M., Munoz, M., Risopatron, J., & Sanchez, R. (2006):** Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification. *International Journal of Morphology*, 24-31.
- Shah D, Rasappan, Shila, & Karthik G. (2019).** A simple method of human sperm vitrification. *MethodsX*, 6, 2198-2204.
- Tamburrino, L., Traini, G., Marcellini, A., Vignozzi, L., Baldi, E., & Marchiani, S. (2023).** Cryopreservation of Human Spermatozoa: Functional, Molecular and Clinical Aspects. *Int J Mol Sci*, 28, 24(5), 4656. doi: 10.3390/ijms24054656.
- Tunalı G. (2014).** Sperm kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü. *Androloji Bülteni*, 57, 123-128.
- Van der Horst, G., & Maree, L. (2010).** SpermBlue®: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis, *Biotechnic & Histochemistry*, 84(6), 299-308.
- Vajta, G., & Nagy, Z.P. (2006).** Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*, 779-796.
- Wetzels, A.M.M., Bras, M., Lens, J.W., Piederiet, M.H., Rijnders, P.M., Zeilmaker, G.H. (1996).** Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/Theory*, 229-244.
- Zakošek, P.M., Casal, M.L., Šterbenc, N., Virant, K.I., & Mrkun, J. (2020).** Vitrification Using Soy Lecithin and Sucrose: A New Way to Store the Sperm for the Preservation of Canine Reproductive Function *Animals*, 10(4), 653. doi.org/10.3390/ani10040653