



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TREHALOZ'UN DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ KOÇ
SPERMLERİ İNCE YAPISI ÜZERİNE KRİYOPROTEKTİF
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

CENNET ERDOĞAN ALTINTAŞ

**Kasım 2018
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TREHALOZ'UN DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ KOÇ
SPERMLERİ İNCE YAPISI ÜZERİNE KRİYOPROTEKTİF
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

CENNET ERDOĞAN ALTINTAŞ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nazan KESKİN

Denizli, 2018

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Cennet ERDOĞAN tarafından, Doç. Dr. Nazan KESKİN yönetiminde hazırlanan "Trehaloz'un Dondurulmuş Çözdürülmüş Koç Spermeleri İnce Yapısı Üzerine Kriyoprotektif Etkisinin Araştırılması" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Gülçin METE
Pamukkale Üniversitesi



Danışman:

Doç. Dr. Nazan KESKİN
Pamukkale Üniversitesi



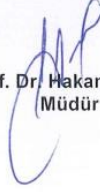
Üye:

Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK
Selçuk Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22.11.2018 tarih ve 2018/28-8 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Cennet ERDOĞAN ALTINTAŞ

İmza :



ÖZET**TREHALOZ'UN DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ KOÇ SPERMLERİ İNCE YAPISI ÜZERİNE KRIYOPROTEKTİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Cennet ERDOĞAN ALTINTAŞ
Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji AD
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Nazan KESKİN

Kasım 2018, 45 Sayfa

Türlerin genetik korunmaları için yapılan sperm kriyoprezervasyonu işlemlerinde, hücrelerde ince yapı düzeyinde kriyohasarlarda meydana gelir. Kriyoprotektanların, spermatozoa kriyohasarlara karşı koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada, trehalozun dondurulmuş-çözdürülmüş koç spermleri üzerine kriyoprotektif etkileri ince yapı düzeyinde araştırılmıştır. Bu amaçla, Merinos koçlarından toplanan ejakülatlar karıştırılmış ve 37 °C'de değerlendirilmiştir. Karıştırılmış semen örnekleri altı kısma bölünmüştür. Daha sonra, %5 gliserol, %3 gliserol + 60 mM trehaloz, %1,5 gliserol + 100 mM trehaloz, %5 etilen glikol, %3 etilen glikol + 60 mM trehaloz ve % 1,5 etilen glikol + 100 mM trehaloz grupları temel tris sulandırıcısıyla sulandırılarak 5 °C'de soğutulmuş ve daha sonra 0.25 ml'lik payetlerde sıvı azot içinde saklanmıştır. Elektron mikroskopisi için örnekler, 37 °C'de çözdürülmüş ve sulandırıcılarını uzaklaştırmak için santrifüj edilmiştir. Karnovsky fiksatifinde tespit edilen örneklerin osmiyumtetroksit ile ikinci tepit işlemi yapılmıştır. Daha sonra, dereceli alkol serilerinden geçirilen örnekler, propilen oksit ile muamele edilerek Araldite gömülmüşlerdir. Yarı ince kesitler Toluidin Mavi'si (TB) ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. Negatif boyanmış ince kesitler Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskopunun (FESEM, Carl Zeiss, Supra 40 VP) STEM dedektörü ile incelenmiştir.

Tüm gruplarda, spermlerde membran deformasyonları, vakuolizasyon, yapısal genişlemeler, aksonem ve mitokondri hasarları, çift kuyruk, ince yapı düzeyinde ayırt edilmiştir. Elektron mikroskopunda gözlenen sperm ince yapı değişikliklerine göre yapılan istatistiksel analizde, en az hasarın % 5 etilen glikol ve % 1,5 etilen glikol + 100 mM trehaloz içeren gruplarda olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, kriyoprezervasyonun spermlerde ince yapı hasarlarına yol açtığı, %1,5 etilen glikol/100 mM trehaloz karışımının sperm kriyohasarını aza indirgeyerek kriyoprotektif etki sağladığı ileri sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: Kriyoprezervasyon, Trehaloz, Spermatozoa, Geçirimli Elektron mikroskopisi

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje no: 114O642).

ABSTRACT

**ULTRASTRUCTURAL INVESTIGATION OF THE CRYOPROTECTİVE EFFECTS OF
TREHALOSE ON
FROZEN-THAWED RAM SPERMATOOZA**

Cennet ERDOĞAN ALTINTAŞ
M.Sc. Thesis in Histology and Embryology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nazan KESKİN

November 2018, 45 Pages

In the sperma cryopreservation processes applied for genetic conservation of species, ultrastructural cryodamages occur in the cells. It has been known that cryoprotectants have protective effects against cryodamages of spermatozoa.

In this study, the cryoprotective effects of trehalose on frozen-thawed ram spermatozoa were investigated at the ultrastructural level. For this purpose, ejaculates collected from Merino rams were pooled and evaluated at 37 °C. Pooled semen samples were divided into six parts. Then, they were diluted with a Tris-based extender containing additives including % 5 glycerol, % 3 glycerol + 60 mM trehalose, % 1,5 glycerol + 100 mM trehalose, % 5 ethylene glycol, % 3 ethylene glycol + 60 mM trehaloz, % 1,5 ethylene glycol + 100 mM trehalose. Then, they all were cooled to 5 °C and then frozen in 0.25 ml French straws in liquid nitrogen. Samples were thawed at 37 °C and centrifuged to remove the diluents for electron microscopy. Samples were fixed in Karnovsky's fixative and then post-fixed with osmiumtetroxide. Then, samples were dehydrated in graded ethanol series, treated in propylene oxide and embedded in Araldite. Semithin sections were stained with Toluidin Blue (TB) and examined with light microscope. Negatively stained ultrathin sections were examined with by STEM detector of Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM, Carl Zeiss, Supra 40 VP).

In all groups, membrane deformations, vacuolization, structural expansions, axonem, mitochondria damages and double tail in spermatozoa were ultrastructurally distinguished. In the statistical analyses performed according to ultrastructural damages of spermatozoa observed by electron microscopy, the least damages were determined in the groups of containing %5 ethylene glycol and %1,5 ethylene glycol + 100 mM trehalose.

As a result, it can be suggested that cryopreservation causes ultrastructural damages in spermatozoa and 1,5% ethylene glycol/100 mM trehalose mixture provide a cryoprotective effect by reducing the sperm cryodamages.

Keywords: Cryopreservation, Trehalose, Spermatozoa, Transmission Electron microscopy

This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (Project no: 114O642).

TEŞEKKÜR

Eğitimim sürecinde varlığı ve manevi desteğinden güç aldığım; tezimin planlanmasında, içeriğinin düzenlenmesinde, tez sonuçlarının yorumlanmasında, tezin her aşamasında özverilerini, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr. Nazan KESKİN'e, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof Dr. Gülçin ABBAN METE'ye, Sayın Prof. Dr. Emin Oğuzhan OĞUZ'a, hayvan deneyleri sırasında destekleri ile Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK'a ve ekibine,

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndaki bölüm arkadaşlarıma,

Tezimin finansal desteğinden ötürü, TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU'na,

Bu alanda ilerlememe vesile olan, beni en iyi koşullarda yetiştiren, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve beni her daim koşulsuz seven aileme, annem Uzm. Dr. Anna ERDOĞAN'a ve biricik babam Sami ERDOĞAN'a teşekkür ve minnet borçluyum.

Evladım Yasemin; her şey senin sayende. Seni çok seviyorum ve varlığına şükrediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	V
ABSTRACT	Vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
1. GİRİŞ	1
1.1. AMAÇ	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Spermatogenez.....	3
2.2. Spermiyogenez.....	4
2.3. Koçlarda Spermatogenez.....	6
2.4. Spermatozoon Yapısı.....	6
2.5. Sperm İnce Yapısı.....	8
2.5.1. Baş.....	8
2.5.2. Boyun.....	9
2.5.3. Orta, Esas ve Son Parçalar.....	10
2.6. Kriyoprezervasyonda Kriyohasarlara.....	13
2.7. Koç Spermının Dondurulmasında Kullanılan Kriyoprotektanlar.....	14
2.7.1. Sakkaritler.....	15
2.8. Hipotez.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	17
3.1. Hayvan Deneyleri.....	17
3.2. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu Uygulamaları	18
3.3. İstatiksel Analiz.....	18
4. BULGULAR	19
4.1. Işık Mikroskobu Bulguları	19
4.2. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları	20
4.3. Elektron Mikroskobu Verilerinden İstatiksel Analiz.....	32
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR	37
7. KAYNAKLAR	38
8. ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1: Spermatogenik hücre serisinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2: Memeli spermatozoası şekli.....	7
Şekil 3: Sperm ince yapısı 1.....	8
Şekil 4: Spermatozoon boyun bölgesi diagram şekli.....	10
Şekil 5: Sperm ince yapısı 2.....	12
Şekil 6: Spermlerin baş ve kuyruk bölgelerinden geçen boyuna ve enine kesitleri...	19
Şekil 7: Grup 1'de (Kontrol 1) hasarlı spermler.....	21
Şekil 8: Grup 4'de (Kontrol 2) hasarlı spermler.....	22
Şekil 9: Grup 2'de hasarlı spermler	23
Şekil 10: Grup 3'te hasarlı spermler	24
Şekil 11: Grup 3'te hasarlı spermler	25
Şekil 12: Grup 3'te hasarlı spermler	26
Şekil 13: Grup 3'te hasarlı spermler	27
Şekil 14: Grup 5'de hasarlı spermler.....	28
Şekil 15: Grup 6'da hasarlı spermler.....	29
Şekil 16: Grup 6'da hasarlı spermler.....	30
Şekil 17: Grup 6'da hasarlı spermler.....	31

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Elektron Mikroskopunda tespit edilen hasarsız sperm yüzdeleri.....	32



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKS	Aksonema
AKR	Akrozom
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EM	Elektron mikroskobu
FESEM	Field Emission Scanning Electron Microscope
GSH	Redükte Glutasyon
M	Molar
ml	Mililitre
mOsm	Osmolarite
μ l	Mikrolitre
OsO ₄	Osmiyum tetra oksit
PAS	Periyodik Asit Schiff
pH	Potential of hydrogen
TB	Toluidin blue
°C	Santigrat Derece

1. GİRİŞ

Hayvancılıkta, üreme biyoteknolojisinde, en verimli ırkı belirlemek amacıyla, sperma kriyoprezervasyonu yapılarak suni tohumlama yoluyla gebelik çalışmalarının araştırılması yoğun bir şekilde yapılmaktadır.

Sperma kriyoprezervasyonu, sperma hücrelerini içeren semen sıvısının daha sonra kullanılmak üzere kriyoprotektanlar yardımıyla dondurulması işlemidir. Ancak, kriyoprezervasyonda, düşük sperm canlılığı en önemli problem olarak ortaya çıkmaktadır. Kriyoprezervasyonda, sperma'da buz kristallerinin oluşması (Watson 1995), morfolojide, hareketlilikte, mitokondriyal aktivitelerde ve canlılıkta değişimler şeklinde (O'Connell vd 2002) sperm fonksiyonunu etkileyen birçok hücresel hasar oluşur (Sieme vd 2015). Hücrelerin dondurma işlemleri sırasında, hücrelerde plazma zarı kaybı, akrozom reaksiyonu benzeri değişiklikler, akrozomal bileşenlerin düzensiz dağılımı veya kaybı (Prinosilova vd 2012), DNA instabilitesi (Peris vd 2007), lipid içeriğinde değişiklikler (Cerolini vd 2001), sperm fragmentasyonu, DNA kondensasyon artışı ve apoptozis (Anzar vd 2002) meydana gelir. Kriyoprezervasyon sonrası ortaya çıkan bu hasarlar sperm fertilizasyonunu olumsuz yönde etkiler.

Kriyoprezervasyon sonucu oluşan kriyohasaratları en aza indirmek için, farklı kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Son yıllarda, trehalozun koç spermasının dondurulmasında kriyoprotektan olarak kullanılan etkili maddelerden biri olduğu ortaya konmuştur (Woelders vd 1997; Aboagla ve Terada 2003; Aisen vd 2000, 2002, 2005; Bucak vd 2007; Gutiérrez-Pérez vd 2009; Jafaroghli vd 2011; Athurupana vd 2015).

Kriyoprotektanların etkilerini belirleme çalışmalarında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Elektron mikroskopinin, optikal mikroskopiye göre zar hasarlarını oldukça belirgin bir şekilde ortaya koyması bakımından, spermatojenik hücrelerin araştırılmasında dolayısıyla kriyohasaratların ince yapı düzeyinde belirlenmesinde kullanılan en iyi yöntem olduğu belirtilmiştir (Prinosilova vd 2012; Özkavukçu vd 2008).

1.1. AMAÇ

Bu çalışmada, trehalozun dondurulmuş çözdürülmüş koç sperması üzerine olası kriyoprotektif etkisi, geçirimli elektron mikroskopi teknikleriyle ince yapı düzeyinde ve elektron mikroskobu kesitlerinden yapılacak istatistiksel analizi ile araştırılması amaçlanmıştır. Elektron mikroskobu mikrograf görüntüleri ve bu görüntülerden elde edilecek istatistiksel sonuçlar, sperma kriyoprezervasyonu yöntemlerine ve literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.



2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Spermatogenez

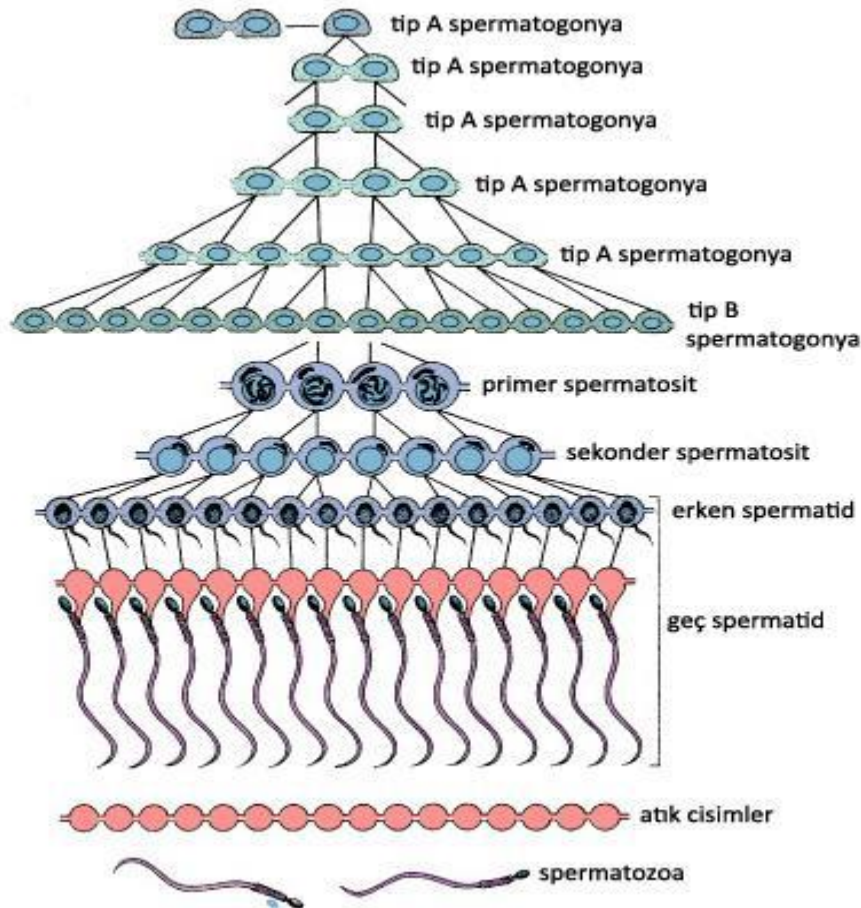
Sperm oluşum sürecine spermatogenez denir (Şekil 1). Bu süreç, seminifer tübüllerin bazalinde yer alan spermatogonik hücrelerin mitoz bölünmelerini içerir. Spermatogenez 3 evreden oluşur.

1. Spermatogonyal faz: Mitoz bölünmeler sonucu, spermatogonyum farklılaşarak primer spermatositi oluşturur.

2. Spermatosit fazı (mayoz): Mayoza giren primer spermatositler, kromozomlarını diploid sayıdan haploid sayıya indirgeyerek spermatidleri oluşturur.

3. Spermatid fazı (spermiogenez): Spermatidler farklılaşarak olgun spermleri oluşturur.

Spermatogonik hücreler, tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum olmak üzere iki tip hücreden oluşur. Koyu tip A spermatogonyumlar kök hücrelerdir ve bölünerek diğer koyu tip ve soluk tip A spermatogonyumlarını meydana getirir. Soluk tip A spermatogonyumlar kendilerini çoğaltırlar ve tip B hücrelerini oluştururlar. Tip B hücreleri mitoz bölünmeler ile çoğalırlar ve ilk mayotik bölünmeye başlayarak sekonder spermatositleri oluşturacak olan primer spermatositleri meydana getirirler. Sekonder spermatositler ikinci mayotik bölünmeleri tamamlarlar ve yuvarlak spermatidleri üretirler. Mayotik bölünmeler sırasında, her bir hücrede kromozom sayısında ve DNA miktarında azalma meydana gelir. İkinci mayotik bölünme tamamlandıktan sonra, spermatidler 23 tek kromozom içerir ($22+X$ ya da $22+Y$). Spermatidler daha fazla bölünmezler buna karşılık, spermiyogenez adı verilen bir süreç geçirerek, yuvarlak hücre görünümünden, çekirdek içeren baş ve kuyruğu ile sperm'e dönüşerek morfolojik bir değişim geçirirler.



Şekil 1: Spermatogenik hücre serisinin şematik gösterimi (Dym M. ve Fawcett DW. 1971).

2.2. Spermijogenez

Spermijogenez spertmatogenezin son aşamasıdır. Üç aşamadan oluşur: Flagellum gelişimi, akrozom gelişimi ve nukleer yoğunlaşma.

1) Flagellumun gelişimi: Flagellum, distal sentriyolden gelişir. Fibröz kılıf ile çevrili 9+2 mikrotübül yapısındadır. Mitokondriler kuyruğun orta parçasında sarmalimsi bir kılıf oluşturur.

2) Akrozom gelişimi: Döllenme için şart olan hidrolitik enzimlerin depolandığı akrozomal kesenin oluşumudur. Akrozomun gelişmesi dört ardışık evreden oluşur: Golgi evresi, kep/şapka evresi, akrozomal evre ve olgunlaşma evresi.

Golgi evresi: Spermatidlerin sitoplazmasında nukleusun yanında belirgin bir golgi aygıtı, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve endoplazmik retikulum bulunur. Periyodik-asit Schiff (PAS) pozitif proakzomal granüller golgi aygıtında birikir. Proakrozom granülleri glikoproteinden zengindir ve bir süre sonra zarla çevrili bir

akrozom vezikülü ile birleşir. Böylece büyük, tek bir granül içeren akrozom granülü oluşur. Akrozom granülü daha az yoğun akrozom vezikülüyle çevrilir. Vezikül ve granül çevredeki golgi ürünlerinin katılımıyla büyümeye devam eder. İyi gelişmiş düz endoplazmik retikulum ile golgi cisimciği arasında birçok bağlantı bulunur. Spermin gelişiminin bu aşamasında, mitokondriler sitoplazmanın kenarına doğru göç ederek plazma zarına yakın yerleşir. Akrozom granülü ve vezikülü oluşurken iki adet silindirik şekilde ve birbirine dik konumdaki sentriyol, oluşan akrozomun aksi yönünde, çekirdeğin arkasına doğru hareket eder.

Kep evresi: Akrozom vezikülü ve granülünden akrozom başlığı oluşur ve çekirdeğin tüm ön kısmını kapsar. Akrozom başlığı akrozom içeriğini kapsayacak biçimde iç ve dış akrozom zarlarını oluşturur. Çekirdek zarı ve iç akrozom zarı arasında granüler filamentöz bir madde meydana gelir. Akrozom bölgesinde çekirdek zarı porlarını kaybeder ve daha yoğun görünür. Bunun nedeni ise, iç tarafındaki kromatinin yoğunlaşmasıdır.

Akrozom evresi: Spermatid çekirdeği ön kısmı, seminifer tübüllerin bazaline doğru yerleşir. Çekirdek uzar ve kromatin yoğunlaşması olur. Spermatid sitoplazması, seminifer tübül epitelinin luminal bölgesine doğru yer değiştirir. Çekirdeğin akrozom bölgesi plazma zarına yaklaşır ve hücre uzar. Çekirdek progresif olarak yassılaşır ve uzar. Bu sırada kromatin granülleri genişler, boyları eşitlenir ve aralarda görülen bazı boşluklar dışında homojen bir biçimde dağılır. Bu boşluklar ve vakuoller genellikle kaybolur ve son aşamalarda çekirdek oldukça koyu boyanan homojen bir görünüme kavuşur. Akrozom büyümesini tamamladığında, golgi kompleksi çekirdeğin ön kutbundan sitoplazmanın bol olduğu bölgeye göç eder.

Olgunlaşma evresi: Bu aşamada spermatid sitoplazması atılır ve sertoli hücrelerince fagosite edilir. Daha sonra sertoli hücreleri, geç spermatidlerin tübül lümenine doğru serbest hale gelmesini de sağlar.

3) Nukleer yoğunlaşma: Somatik histonlar, arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nukleer yoğunlaşma oluşur. Bu da sperm genomik DNA'sını stabilize eder ve korur. Somatik histonların protaminlere dönüşümünden sonra, nukleozomlar kaybolur ve çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilirler. Nukleus uzar ve yoğunlaşır.

Spermiler seminifer tübül lümeninden pasif taşıma yoluyla, depolanıp işlevsel olarak olgun hale gelecekleri epididimise geçerler. Buradan da vas deferens yardımıyla üretraya ulaşırlar. Spermatogonyumun olgun sperm haline gelmesi için gereken süre yaklaşık 64 gündür (Junqueira ve Carneiro 2009).

2.3. Koçlarda Spermatogenez

Koçlarda, spermatogenez 46-49 gün kadar sürer. Epididimal taşınma ise yaklaşık 12-14 gün arasında değişir. Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tübül lümenine geçen spermatozoonlar, rete testis aracılığı ile epididimise taşınırlar. Epididimal göç sırasında olgunlaşan spermatozoonlarda, membran geçirgenliğinin artması, akrozomda büyüme ve gelişme, kuyruk organellerinin biçim ve yerlerinde değişimler, kromatinde yoğunlaşma ve başın büyümesi gibi yapısal değişiklikler meydana gelir. Ayrıca, epididimal göç sırasında sitoplazmik damlacıklarını kaybederler ve motilite yeteneğini de kazanırlar. Ejakülasyon sırasında eklenti bezleri salgıları spermatozoonlar ile karışarak ejakülatı oluştururlar (Çoyan vd 2002).

2.4. Spermatozoon Yapısı

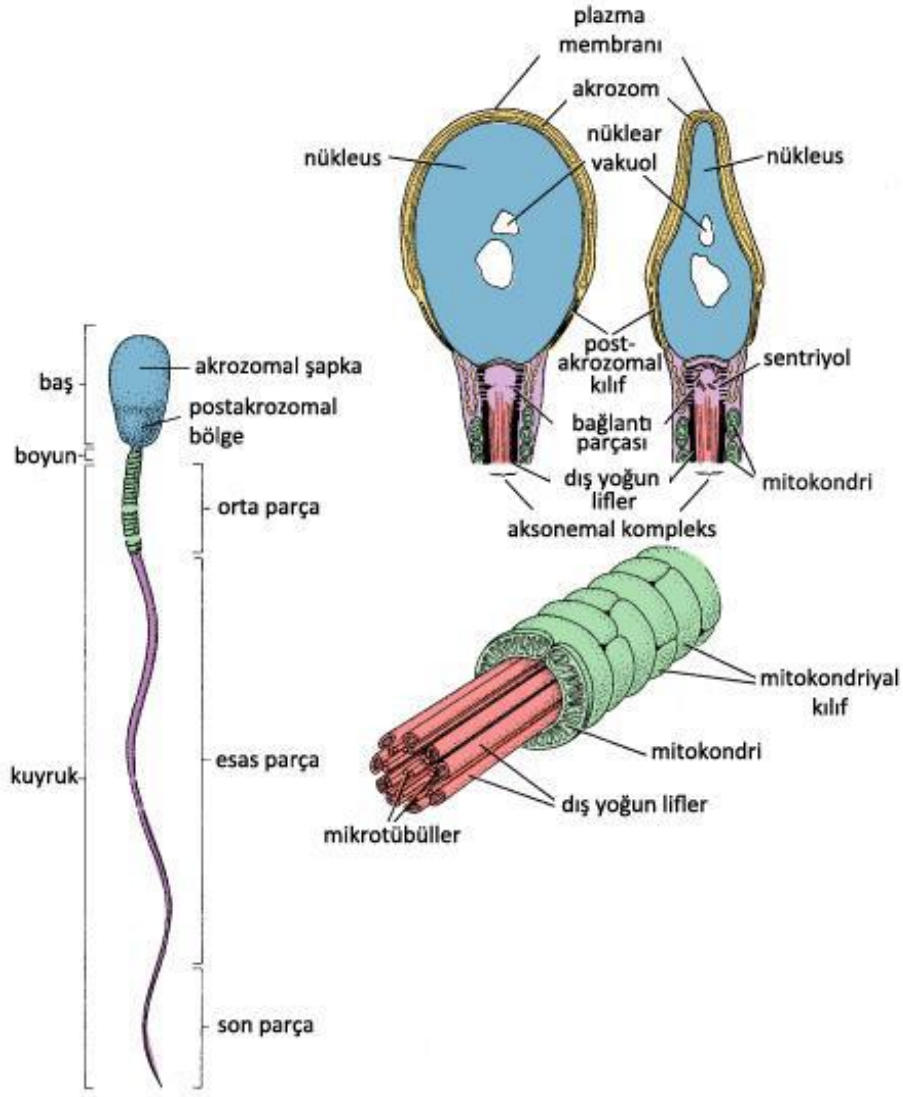
Spermatozoonlar başlıca, baş ve kuyruk kısımlarından oluşur (Şekil 2). Oosit'e penetrasyonu sağlayan baş kısmıdır ve içerisinde nukleus ile akrozom bulunur. Kuyruk ise boyun, orta parça, esas parça ve son parçadan oluşur. Sperma motilitesinde gerekli olan enerji kaynağını sağlayan mitokondri, orta kısımda bulunur. Kuyruk, spermanın uterus ve ovidukta ilerleyerek oositle karşılaşip penetre olmasını sağlar. Spermatogenezin son aşamasında bölünme yeteneğini kaybeden spermatozoon, hareket özelliği kazanarak özel bir yapıya bürünür.

Olgun insan spermi yaklaşık 60 µm uzunluğundadır. Sperm başı yassıdır, sivridir ve 4,5 µm uzunluğunda olup 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır.

Baş: Baş kısmı nukleus ve akrozomu içerir. Temel görevi DNA materyalini korumaktır.

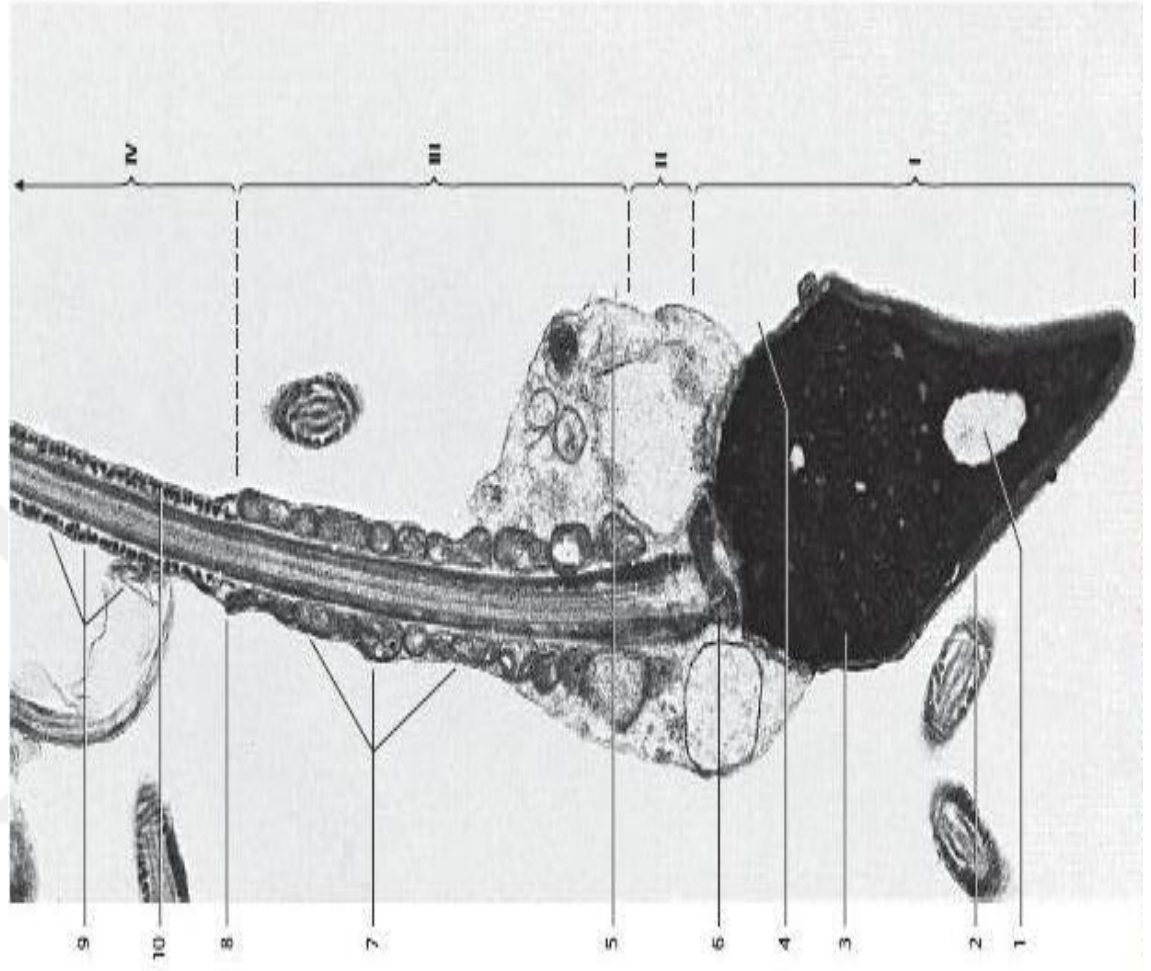
Kuyruk: Sperma kuyruğu, boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere bölümlere ayrılır. Kısa olan boyun kısmı, sentriolleri ve kaba fiberlerin başlangıçlarını içerir. Orta parça, yaklaşık 7 mm uzunluğundadır ve mitokondriyonları içerir. Mitokondriyonlar, kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin etrafında sarmal olarak yerleşmiştir. Kuyruğun hareketi için gerekli enerjiyi sağlarlar, böylece spermin hareketinden sorumludurlar. Aksonem, 9 dış çift mikrotübül yapısı ile ortada bir çift mikrotübülden oluşur. Esas parça, yaklaşık 40 µm uzunluğundadır ve kalın fiberler ile aksonemal kompleksin dışındaki fibröz kılıfı içerir. Son parça, olgun spermde

flagellumun yaklaşık son 5 µm'lik kısmıdır ve yalnızca aksonemal kompleksi içerir (Ross 2014).



Şekil 2: Memeli spermatozoası şekli (Pederson PL, Fawcett DW. In: Hafez ESE, ed. Human Semen and Fertility Regulation in the Male. St.Louis: CV Mosby, 1976.'dan modifiye edilmiştir).

2.5. Sperm İnce Yapısı



Şekil 3: Sperm ince yapısı 1. I = Baş kısmı: 1. Nukleer vezikül, 2. Akrozom, 3. Nukleus, 4. Post akrozomal bölge. II = Boyun kısmı: 5. Sitoplazmik droplet, 6. Bağlantı bölgesi. III = Orta kısım: 7. Mitokondriler, 8. Annulus. IV= Esas Parça: 9. Fibröz kılıf, 10. Aksonem. (Kuehnel W. Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy. Thieme, New York, 2003, s. 386-387).

2.5.1. Baş

Akrozom ve nukleusu içeren sperm başı, plazma zarı ile çevrilidir (Şekil 3). Akrozom, akrozin, hiyaluronidaz ve diğer birçok hidrolazlar ile esterazları içerir. Bu enzimler, zona pellusida'nın lizisinde ve oosit korona radiatasına penetrasyonda rol oynarlar. Akrozom, kapak şekilli bir yapı olarak sperm başının 2/3'sini kaplar. Şekli, türlerde spesifiklik gösterir. Akrozom, iç ve dış zarlari içerir. Bu zarlari, akrozomun distal kısmında birleşirler ve amorf, düzgün granüllü, elektronca yoğun içeriği çevrelerler.

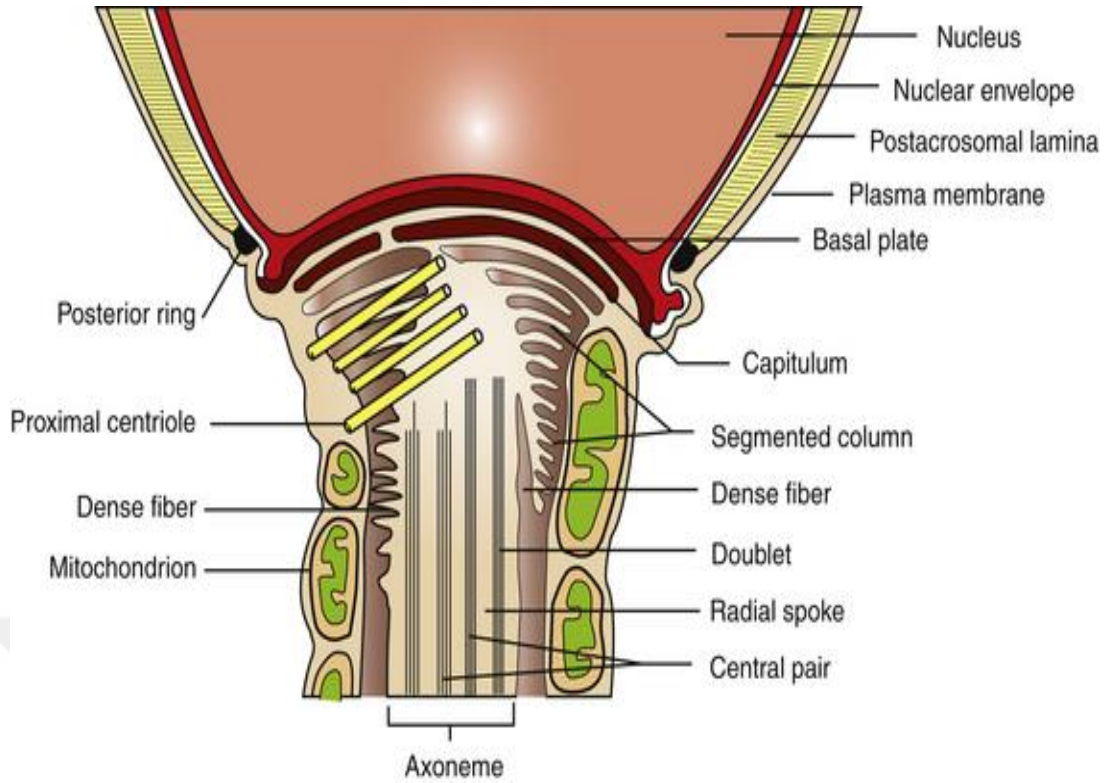
Nukleus, yoğun kromatin içerir. Şekli ve büyüklüğü türlere göre farklılık gösterir. Elektron mikroskopta, nuklear zar sıklıkla karyoplazmadan ayrılmış olarak görünür. Bu

durum fiksasyon artefaktı olarak değerlendirilir. Ayrıca, yoğun kromatin içinde rasgele yeralan, zarla çevrelenmemiş küçük boşluklar yer alır (Pesch ve Bergmann 2006). Bu nuklear vakuoller, kromatin kondensasyonundaki lokal defektler olarak görünmektedir, ve memeli spermatozoası için tipiktir (Fawcett 1970; Rován 2001, Pesch ve Bergmann 2006'dan).

Nuklear zar ve iç akrozomal zar, nuklear kılıfı oluşturur. Sitoplazma ve sitoiskeletin polimer proteinleri, akrozom ve nukleus arasında bulunduğu gibi sadece plazma zarı ile akrozomal zar arasındaki küçük aralıkta da bulunur (Pesch ve Bergmann 2006).

2.5.2. Boyun

Boyun; baş ve flagellum arasındaki kısa bir bağlantı bölgesidir (Şekil 4). Bağlantı, eklem parçası olarak iş görür, yaklaşık 1 mm uzunluktadır (Pesch ve Bergmann 2006). Anteriordan bazal plaka ile, posteriordan flagellumun dış yoğun fibrilleri ile bağlantılıdır. Segmentli bir kolon ile yoğun fibril yapısındaki kapitulumu içerir. Kapitulumun yanında proksimal sentriol bulunur. Olgun spermatozoa'da distal sentriol bulunmaz. Proksimal sentriol spermiyogenezin erken evrelerinde flagellumun bazal kısmı olarak rol alır. Erken spermatid evresinde, çapraz-çizgili fibrilli proteinler sentriolün çevresinde farklılaşır ve daha sonra iki major ve 5 minor kolonu oluştururlar. İki major kolonun herbiri ikiye ayrılır, sonuçta boyun ve orta kısmın birleşme yerinde, flagellumun benzer çaptaki 9 kolonu ve bunu takiben 9 yoğun dış fibrilleri meydana gelir. Bağlantı bölgesinde uzunlamasına kolonlar arasında küçük çıkıntısıyla tek bir mitokondrium ayırılır. Enerji kaynağı olarak rol alır (Fawcett 1969; Mortimer 1997; Piasecka ve Kawiak 2003; Pesch ve Bergmann 2006'dan).



Şekil 4: Spermatozoon boyun bölgesi diagram şekli. Başın taban kısmıdır. Kapitulumla bağlı bazal plakayı içerir. Kapitulum, esas parçanın en proksimaldeki yapısıdır. (McKinnon AO, Voss JL: Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1993) (<https://veteriankey.com/sperm-physiology/>).

2.5.3. Orta, Esas ve Son Parçalar

Kuyruk, spermın en uzun kısmıdır (Şekil 5). Orta, esas ve son parçalardan oluşur. Orta parça, yaklaşık 5 µm uzunluğundadır ve mitokondriyal kılıf ile karakterizedir. Bu kılıf, aksonemal kompleksi ve 9 yoğun dış fibrilli sarar. Yoğun dış fibril ve fibril kılıf, yapıya has, kuyruğu basit flagellum ve sil'den ayıran, merkezi aksonem boyunca yer alan 2 sitoiskelet birimidir (Olson vd 1976; Irons ve Clermont 1982; Oko ve Clermont 1989, Pesch ve Bergmann 2006'dan). Yoğun dış fibriller, türlerde fertilizasyonda karakteristik yapılardır (Fawcett 1970, Pesch ve Bergmann 2006'dan). Canlılıkla mitokondri sayısı arasında pozitif korelasyon vardır: Çok sayıda mitokondri içeren memeli spermi, örneğin iki mitokondri içeren sucul omurgalılara göre daha yüksek canlılığa sahiptir (Rovan 2001, Pesch ve Bergmann 2006'dan).

Aksonemal kompleks, merkezi bir çift (2 tek) mikrotübülden oluşur. Bunlar, düzgün bir şekilde düzenlenmiş çifte silindirik bir mikrotübül demetiyle çevrelenmiştir. İki merkezi tübül çifti birbirine kısa köprülerle bağlanır (Warner 1976; Olson ve Linck 1977, Pesch ve Bergmann 2006'dan). Mikrotübül çiftinin A alt birimi halkasal enine kesitte

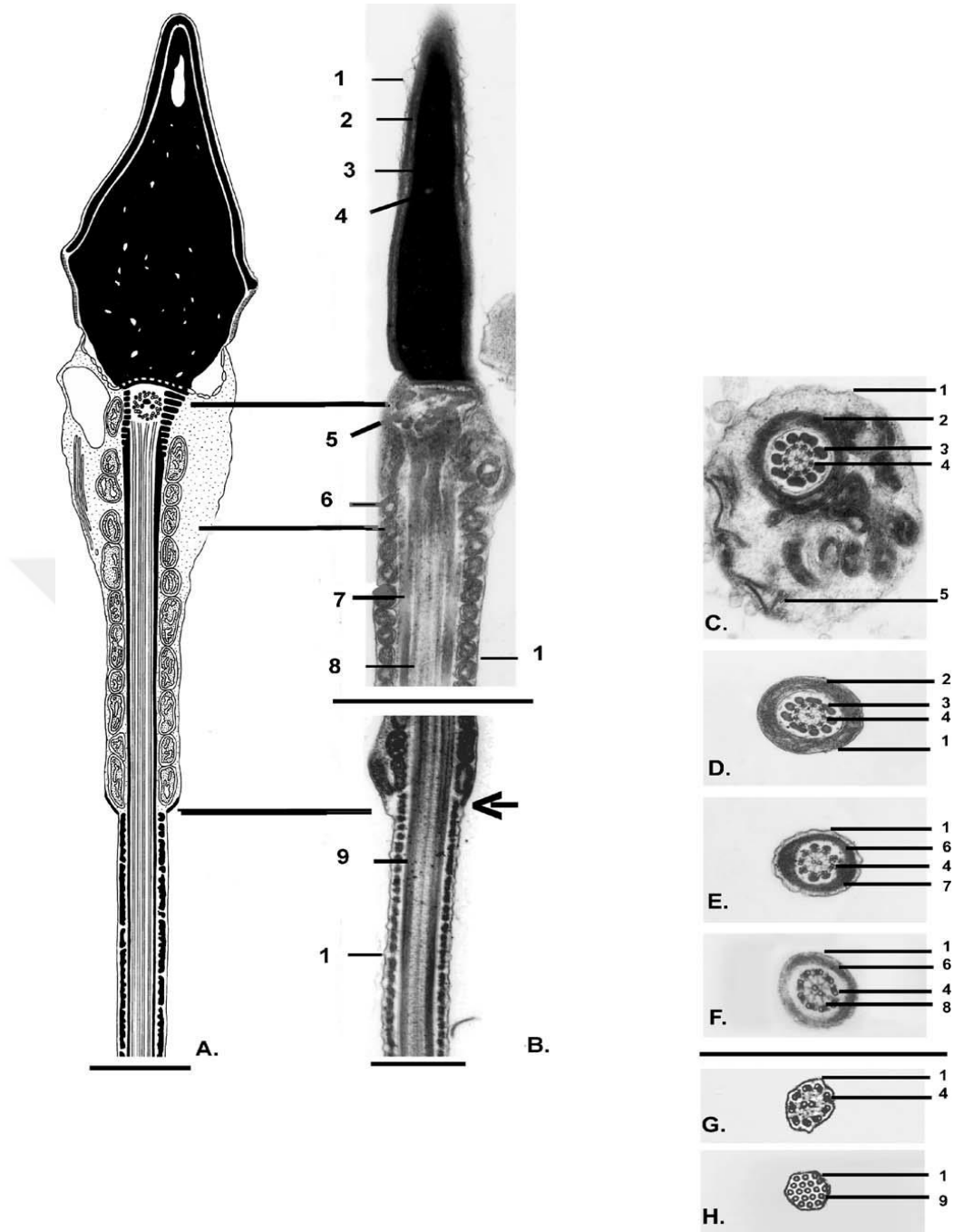
tam tübül yapısındadır. İki kısa ayrılan kol tübül çiftinin yakınına uzanır (Afzelius 1959; Gibbons ve Grimstone 1960, Pesch ve Bergmann 2006'dan). Bu alt birim diğerine göre merkezi aksoneme oldukça yakındır. B alt birimi tam değildir, A'nın çapına göre biraz daha fazla çaplıdır, C Şekilli bir duvar ve kresentik (yarım ay benzeri) lümene sahiptir. İki alt birim de birbirleriyle bağlantılıdır. Bir dizi radyal çıkıntı merkezi mikrotübül çiftinin içine doğru yayılır.

Mitokondriyumlar, yüksek esneklikte kontraktil yapıların etrafında heliks Şekilde u uca düzenlenmiŐlerdir. Sayıları spermiler arasında küçük varyasyonlar gösterir. Fakat türler arasında total uzunlukta büyük farklılıklar vardır.

Dokuz dış yoğun fibril flagellumun proksimal parçasında aksonemde periferik olarak düzenlenmiŐlerdir (Baccetti vd 1976; Fawcett 1975, Pesch ve Bergmann 2006'dan). Yoğun homojen olmayan yapıya ve petal benzeri Őekle sahiptirler. Dış tarafta evrenlenmiŐlerdir. Dar sınıra doğru sivrilirler ve aksonem çiftlerine yönelirler. Yoğun dış fibriller kendi aralarında farklılık gösterirler, genel olarak 3 veya 4 fibril daha büyüktür. Tüm yoğun dış fibriller, orta parçanın proksimal bölgesinde kalındır ve dereceli olarak kuyruğun u kısmının tabanında çapları azalır.

Esas parça en uzun segmenttir. İki boyuna kolondan oluşan fibrilli kılıf (dorsal ve ventral) ve dairesel bağlantılı çıkıntılar tarafından evrenlenmiŐtir. Bu çıkıntılar kolonlara geçiŐlerde kalınlaŐırlar, bazı türlerde birbirleriyle olan bağlantılar nedeniyle geniŐ bandlar oluştururlar. Yüksek büyütmelerde, kolonlar çıkıntı alt birimlerine göre daha az yakın Şekilde paketlenmiŐlerdir. Fibril kılıfın çıkıntıları u kısımları dışında ayrı yapılar Őeklinindedir. Bazen, yzeyssel kesitlerde atallanmıŐ Şekil alır. Bu kılıf kuyruk ucundan 9-10 µm kadar nde, birden sonlanır, burada esas parça son parça içine katılır. Esas parçanın proksimal ucunda boyuna kolonlar ile yoğun dış fibriller 3 ve 8 arasında ve distal kolonlarla ilgili çiftleri arasında bağlantının olduğu bildirilmiştir (Fawcett ve Phillips 1969, Pesch ve Bergmann 2006'dan). Bunun, hareket sırasındaki dalgalanmada kuyruk yer deęiŐimin önlenmesinde rolü olduğu tartıŐılmaktadır (Fawcett ve Phillips 1969, Pesch ve Bergmann 2006'dan). Fibril kılıf, sinyal yolağında proteinler için bir yapı iskelesi görevi de görür. Dolayısıyla, bu kılıfın, sperm olgunlaŐması, hareketi, kapasitasyon, hiperaktivasyon ve/veya akrozom reaksiyonunda da regülatör rolü vardır (Eddy vd 2003, Pesch ve Bergmann 2006'dan).

En uçta, 9x2+2 yapısı kaybolur ve 9 çift 18 tekli mikrotübülleri oluşturur (Afzelius vd 1995, Pesch ve Bergmann 2006'dan). Fibril kılıf, yoğun dış fibriller ve bazen merkezi tübül çifti bu kısımda bulunmaz. Mikrotübül sayısı dereceli olarak posteriorda azalma gösterir (Pesch ve Bergmann 2006).



Şekil 5: Sperm ince yapısı 2. A; İnsan spermi şematik çizimi (Holstein ve Roosen-Runge 1981). B; at spermi uzunlamasına kesiti, x 20481. C-H; normal sperm kuyruğu çapraz kesiti. C: proksimal orta parça, x 41680. D; distal orta parça, x 35465. E/F; esas parça, x 69377. 1: plazma zarı, 2: akrozom, 3: nukleus, 4: küçük nukleer vakuol, 5: proksimal sentriol, 6: mitokondriyum, 7: dış yoğun fibriller, 8: dış tubul çifti, 9: fibril kılıf. Ok: mitokondriyal heliksli orta parça ile fibril kılıflı esas parça arasındaki bağlantı (Pesch ve Bergmann 2006).

2.6. Kriyoprezervasyonda Kriyohasarlara

Kriyoprezervasyon; biyolojik materyallerin kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra -196 °C'de sıvı nitrojen içinde dondurularak saklanması yöntemidir. Sperma kriyoprezervasyonu, klinikte, inseminasyon, in vitro fertilizasyon ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu gibi diğer işlemlerde de kullanılan bir yöntemdir (Valcarce vd 2013). Bununla birlikte, kriyoprezervasyon sperm hücrelerinde düşük sıcaklıktan kaynaklanan hasarlara yol açar. Dondurma-çözdürme sonrası koç spermelerinin büyük bir kısmı hareketliliğini korumuş olsalarda, sadece %20-30'u biyolojik olarak hasarsız olarak kalır. Bir sperm hareketli olsa da hasarlı da olabilir. Bu durumda, yumurtanın fertilizasyonu gerçekleşmeyebilir. En temel kriyojenik hasar, ince yapıda ve biyokimyasal veya fonksiyonel olarak oluşabilir. İnce yapı değişiklikleri, plazma ve akrozom zarlarında, akrozomda, mitokondriyal kılıfta ve aksonemde meydana gelir. Bu değişiklikler, genel olarak koçlarda boğalara göre daha şiddetlidir. Oluşan hasarlar; ultrastrüktürel (ince yapı), biyokimyasal ve fonksiyonel olarak gösterilebilir. Ultrastrüktürel hasar, plazma ve akrozom membranlarında, akrozomal ve mitokondriyal kılıfta, aksonemde oluşur. Bu hasarlar, boğa spermatozoasına kıyasla koç spermatozoasında daha şiddetlidir (Salamon ve Maxwell 2000).

Koç semeninin hem yavaş hem hızlı dondurulmasından sonra, spermatozoanın motilitesi, morfolojik bütünlüğüne göre daha iyi korunur. Plazma ve akrozom zarları, nükleus ve hücrenin orta parçasına göre daha hassastır. Akrozomun dış zarı ise, iç zarlara göre daha hassastır. Mitokondriyal yapı değişim gösterir, ancak kuyruk filament ve fibrillerinde ayırt edilebilir bir değişim gözlenmez. İnce yapı değişiklikleri, biyokimyasal değişikliklerle birlikte meydana gelir. Sonuçta, hücrenin hayati içeriği bozulur. Bazı kaybolmalar ve değişimler; glutamik oksaloasetik transaminaz salınımı, lipoproteinlerin ve amino asitlerin kaybı, fosfataz aktivitesinin azalması, gevşek bağlı kolesterol protein azalması, sodyum artışı ve potasyum azalışı, hiyaluronidaz ve akrozin enzimleri inaktivasyonu, prostaglandinlerin kaybı, ATP ve ADP sentezi indirgenmesi, akrozomal proteolitik aktivite azalması şeklinde meydana gelir (Salamon ve Maxwell 1995, Salamon ve Maxwell 2000). Kromatin yapıda modifikasyonlar şeklinde DNA denaturasyonunun da gerçekleştiği, boğa, domuz, kedi, insan ve son zamanlarda da koçlarda gösterilmiştir (Gillan ve Maxwell 1999, Salamon ve Maxwell 2000).

Kriyoprezervasyonda, en dikkat çekici değişiklik akrozom bölgesinde, zar yapısında meydana gelir. Daha sonra, hücre zarı ve akrozom arasında ve akrozomun

anterior kısmında şişme ve incelme ortaya çıkar. Akrozomun dış zarı giderek artan bir şekilde düzensiz ve kesikli bir hal alır. Bu farklılaşmanın erken safhalarında, akrozomun ekvatoriyal kısmı genel olarak değişmez, fakat son safhalarda daha az elektronca yoğun ve hafif düzensizlikler gösterir. Bu değişikliklerin sonucu olarak, her ne kadar iç akrozom zarı kısmen korunmuş olsa da, nükleus akrozomun anterior kısmında ayırt edilir hale gelir. Mitokondriler karakteristik değişiklikler gösterir. Matriks yoğunluğu azalır. Bazı bölgeleri elektronca yoğun görülür. Granüllü materyal birikimi oluşur. Genel olarak, 9+2 aksonem yapısı değişmez. Bununla birlikte, fibriller normal hücrelere göre çok daha az belirgindir. Kuyruğun en uç kısmı kuyruğun distal esas parçası boyunca belirgin bir şekilde bükülür. Genellikle, hücreler açık sitoplazmalıdır, organel organizasyonu bozulmuştur, akrozom nükleustan ayrılır, mitokondriler normal hücrelere göre gelişigüzel diziliimli hale gelir (Pedersen ve Lebech 1971).

Kriyohasarin etkileri, mitokondriyal fonksiyonda, hareketlilikte, morfolojide ve canlılıkta olmak üzere insan spermelerinde de gösterilmiştir (O'Connell vd 2002). İnsan spermelerinde en şiddetli etkinin özellikle plazma zarında, akrozomda ve kuyrukta olduğu ortaya konmuştur. Keçi spermelerinde, dondurma-çözdürme işleminin hareket, membran bütünlüğü ve mitokondrilerde belirgin etkilere sebep olduğu ve yine, elektron mikroskopinin sperm deformasyonlarının araştırılmasında güçlü gözlemler sağladığı ileri sürülmüştür (Shi vd 2014). Farelerde, kriyohasarin başlıca akrozomda ve mitokondrilerde olduğu gösterilmiştir (Nishizono vd 2004). Quinn vd 1969, koç spermatozoa'da soğuk şokunun ve dondurmanın etkilerini, akrozomda şişme ve açık görünen mitokondri matriksi şeklinde, López Armengol vd 2012 de, dondurulmuş ve çözdürülmüş koç spermelerinde hasarların akrozomda ve plazma zarında olduğunu bildirmişlerdir.

Bu ince yapı ve ayrıca biyokimyasal kriyojenik değişiklikler, spermelerin fonksiyonel bütünlüğünde, in vivo canlılığında ve fertilizasyon kapasitesinde düşümlere neden olmaktadır (Salamon ve Maxwell 2000).

2.7. Koç Spermalarının Dondurulmasında Kullanılan Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar suda çözünen ve suyun erime noktasını düşüren kimyasal maddelerdir. Reprodüksiyonda, gamet ve embriyoların soğuk şoku ve ozmotik zarara karşı ortamlarına kriyoprotektanların eklenmesi, çözdürme sonrası canlılığı ve fertilitiyi optimize eder (Bucak ve Tekin 2007). Kriyoprotektanların, molekül ağırlıkları düşüktür ve toksik etkiyi, belirli oranların üzerinde kullanıldıklarında gösterirler. Dondurulmuş tüm ortamlar, buz oluşumunu en aza indiren, hücre zarlarını ve proteinlerini stabilize eden

geçirgen ve geçirgen olmayan kriyoprotektanlar içerir (Yeste vd 2017). Geçirgen kriyoprotektanlar hücreye girerler, elektrolit konsantrasyonunu indirgerler, düşük sıcaklıklarda osmotik büzülme alanını azaltırlar (Mazur 1984; Yeste vd 2017'den). Geçirgen kriyoprotektanlara örnek olarak gliserol, dimetilsülfoksit, etilen glikol, metanol, propilen glikol ve dimetilasetamid verilebilir (Gao ve Critser 2000, Yeste vd 2017'den). Geçirgen olmayan kriyoprotektanlar ekstrasellüler olarak rol oynarlar. Geçirgen kriyoprotektanların etkilerini geliştirirler (Benson vd 2012, Yeste vd 2017'den) . En bilinen geçirgen olmayan kriyoprotektanlar, süt ve yumurta sarısı proteinleri, şekerler ve yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerdir (Yeste 2016, Yeste vd 2017'den).

Son zamanlarda çeşitli kriyoprotektanların kullanılmasına yönelik birçok araştırma yapılmaktadır: Ankara tekesi sperması, sulandırıcılarına katılan kriyoprotektanların (okside glutasyon ve kombine grupları) çözündürme sonrası bazı spermatolojik parametreler üzerine önemli katkılar sağladığı ortaya konmuştur (Bucak 2007). Alvarenga vd (2000) aygır sperması kriyoprezervasyonunda, hareketlilik ve akrozom bütünlüğünün korunmasında kriyoprotektan olarak etilen glikol'ün kullanılabileceğini göstermişlerdir. Koç spermasının kriyoprezervasyonunda kriyoprotektan olarak kullanılan gliserol'ün %4 veya %6 oranlarında en iyi canlılık oranını sağladığı ortaya konmuştur (Fiser ve Fairfull 1984). Ayrıca, %7 gliserol ve %20 yumurta sarısı içeren sulandırıcıda en iyi sperm korunmasının sağlandığı da gösterilmiştir (Soltanpour ve Moghaddam (2013). Silva vd 2012, %5 gliserol, %3 ve %5 etilen glikol, %3 ve %5 asetamid'in koç spermasını dondurmanın zararlı etkilerine karşı koruyucu olduğunu, %5 gliserol'ün ise sperm plazma zarını korumada en yüksek etkiyi gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, aygır sperması çözüm sonu parametrelerinde etilen glikol'ün en az hasara yol açtığı, alternatif kriyoprotektanların osmotik stresi indirgeyerek etkili olabileceği bildirilmiştir (Ball ve Vo 2001).

2.7.1. Sakkaritler

Glukoz, sukroz, trehaloz ve rafinoz eksternal kriyoprotektanlardır ve hücre canlılığını etkileyen etkilere yol açan hücre içi kristalleşmeyi engellemek için, hücrede dehidrasyon oluştururlar. Dolayısıyla, eksternal kriyoprotektan olan sakkaritler, hücre içi kristal oluşum sıklığını azaltmak için, ozmotik basıncı artırarak hücresel dehidrasyonu uyarırlar. Şekerler spermatozoon plazma zarındaki fosfolipitlerle etkileşime girerek, kriyoprezervasyonda uygun yaşam ortamı sağlamak amacıyla, zarlarda yeni düzenlemelere yol açarlar.

Trehaloz, iki D-glikoz molekülünün bağlanmasıyla oluşmuş bir disakkarittir (Richards vd 2002, Bucak 2007). Tam olarak etki mekanizması bilinmemekle birlikte,

spermatozoa plazma zarına penetre olduğu, donma ve çözme sırasında zar fosfolipitlerinin polar baş gruplarıyla hidrojen bağları kurduğu, fosfolipitlerde meydana gelen ısı değişimlerini, fosfolipit açil zincirleri arasındaki van der Waals etkileşimlerini, reaktif oksijen radikallerinin salınımını ve bu salınımla beraber spermatozoon ve sperma plazmasındaki redükte glutatyon (GSH) tükenimini azalttığı ileri sürülmektedir. Ayrıca, hücreyle ortam arasında ozmotik tamponlayıcı olarak görev yaparak soğuk şokuna karşı koruma sağladığı bildirilmiştir (McWilliams vd 1995; Gao ve Crister 2000; Aboagla ve Terada 2003; Aisen vd 2005; Purdy 2006, Bucak 2007). Trehalozun kriyoprotektif etkisinin, dehidrasyon aktivitesi ve hücre zarıyla olan etkileşimi ile olduğu rapor edilmiştir (Aisen vd 2000).

Kriyoprezerve koç spermalarında, sitrat, tris tamponu, trehaloz ve EDTA ilavesiyle modifiye edilen sulandırıcılarda, trehaloz ilavesinin zar değerlendirmesinde en iyi sperm kriyoprezervasyonunu sağladığı ultramikroskopi ile gösterilmiştir. Dondurma-çözdürmeden kaynaklanan oksidatif stresin sulandırıcı trehaloz'da indirgenildiği ortaya konmuştur. Trehaloz'un antioksidant özelliğinin zar kriyoprezervasyonunda etkili olabileceği ileri sürülmüştür (Aisen vd 2005). Koç (Aisen vd 2000, 2002, 2005; Bucak vd 2007; Tonieto vd 2010; Jafaroghli vd 2011; Cirit vd 2013), teke (Aboagla vd Terada 2003; Ateşşahin vd 2008), boğa (Chen vd 1993), domuz (Gutiérrez-Pérez vd 2009; Hu vd 2009) ve köpeklerde (Yamashiro vd 2007), sperma sulandırıcılarına trehaloz ilavesi ile yapılan çalışmalarda, zar bütünlüğünün arttığı ortaya konmuştur.

2.8. Hipotez

H1: Bu çalışmanın hipotezi: Koç spermasının kriyoprezervasyonunda trehalozun olası koruyucu etkisi, sperm ince yapısı düzeyindeki gözlemlere dayanılarak yapılacak istatistiksel araştırma ile belirlenebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hayvan Deneyleri

Gruplar:

1. Temel sulandırıcı + %5 gliserol (**Kontrol Grubu 1**)
2. Temel sulandırıcı + %3 gliserol + 60 mM trehaloz
3. Temel sulandırıcı + %1,5 gliserol + 100 mM trehaloz
4. Temel sulandırıcı + %5 etilen glikol (**Kontrol Grubu 2**)
5. Temel sulandırıcı + %3 etilen glikol + 60 mM trehaloz
6. Temel sulandırıcı + %1,5 etilen glikol + 100 mM trehaloz

Koçlardan suni vagen ile alınan ejakülatlar karıştırılmış ve 6 eşit hacme bölünerek yukarıdaki sulandırıcı gruplarıyla (tris bazlı sulandırıcı) tek aşamalı yöntemle göre 37°C'deki su banyosunda inkubasyonu yapılmıştır. Sulandırma işleminin ardından sulandırılmış spermalar oda ısısında (22±2°C) payetlere çekilmiş, uçları polivinil toz ile kapatılarak +5°C'deki buzdolabına yerleştirilmiştir. Isının 5°C'ye düşürülmesinden sonra numuneler yaklaşık 2 saat 5°C'de ekilibrasyon işlemine tabii tutulmuştur. Bunu izleyen süreçte numuneler sıvı azot buharında (~100°C) dondurularak, sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Bu şekilde saklanan spermalar daha sonra, 35°C'deki su banyosunda 10-15 saniye tutularak çözülmüş ve payetlerdeki spermalar epondorflara aktararak, 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek sulandırıcıları uzaklaştırılmıştır.

(Çalışma, Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan, PAUHDEK-2014/014 numarası ile onay almıştır).

3.2. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu Uygulamaları

Sperm örneklerinin Karnovsky solüsyonu ile fikse edilmesinden sonra yıkamalarını takiben, OsO₄ ile ikinci tespit işlemi yapılmıştır. Yıkamaları, yükselen alkol serileri ve propilen oksit uygulamaları yapılan spermler, Araldit gömme ortamına gömülerek bloklanmıştır. Ultramikrotom ile alınan kalın kesitlerden Toluidin mavisi (Toluidin blue-TB) ile boyanarak hazırlanan preparatların görüntülenmesi, Olympus BX53 ışık mikroskobunun Olympus SC30 kamerası ile yapılmıştır (Şekil 6). Her bir grup için, ışık mikroskobu fotoğraflarından tespit edilen bölgelerden ince kesitler alınarak gridlere aktarılmıştır. Negatif boyaması yapılan gridler, Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobunun (Field Emission Scanning Electron Microscope-FESEM, Carl Zeiss, Supra 40 VP) STEM dedektörü ile incelenmiş ve mikrografları alınmıştır.

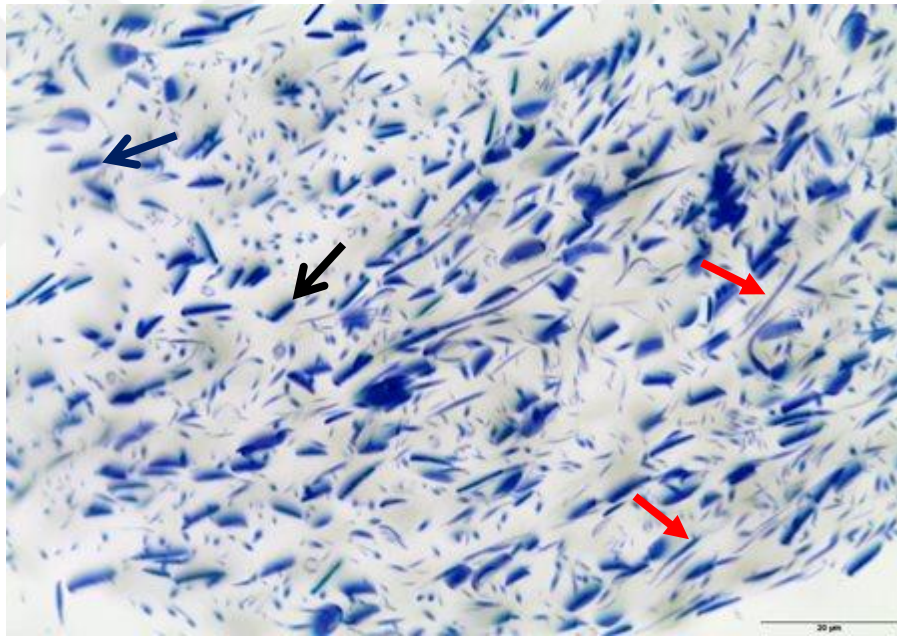
3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için, elektron mikroskobu için hazırlanan 6 gruba ait her bir preparattan en az 500 sperm sayılmıştır. Spermler başlıca membran, aksonem, mitokondri hasarlanmaları gibi deformasyonlar göz önüne alınarak hasarlı ve hasarsız spermler şeklinde sayılarak gruplandırılmıştır. Gruplara göre hasar dağılımları arasındaki farklılıklar ki-kare analizi ile incelenmiştir. Farklılığın P<0,05 düzeyde olması normal kabul edilmiştir (Tablo1).

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskobu Bulguları

Işık mikroskobu fotoğrafında, spermilerin baş ve kuyruk bölgelerinin çeşitli kısımlarından geçen enine ve boyuna kesitleri görülmektedir (Şekil 6).



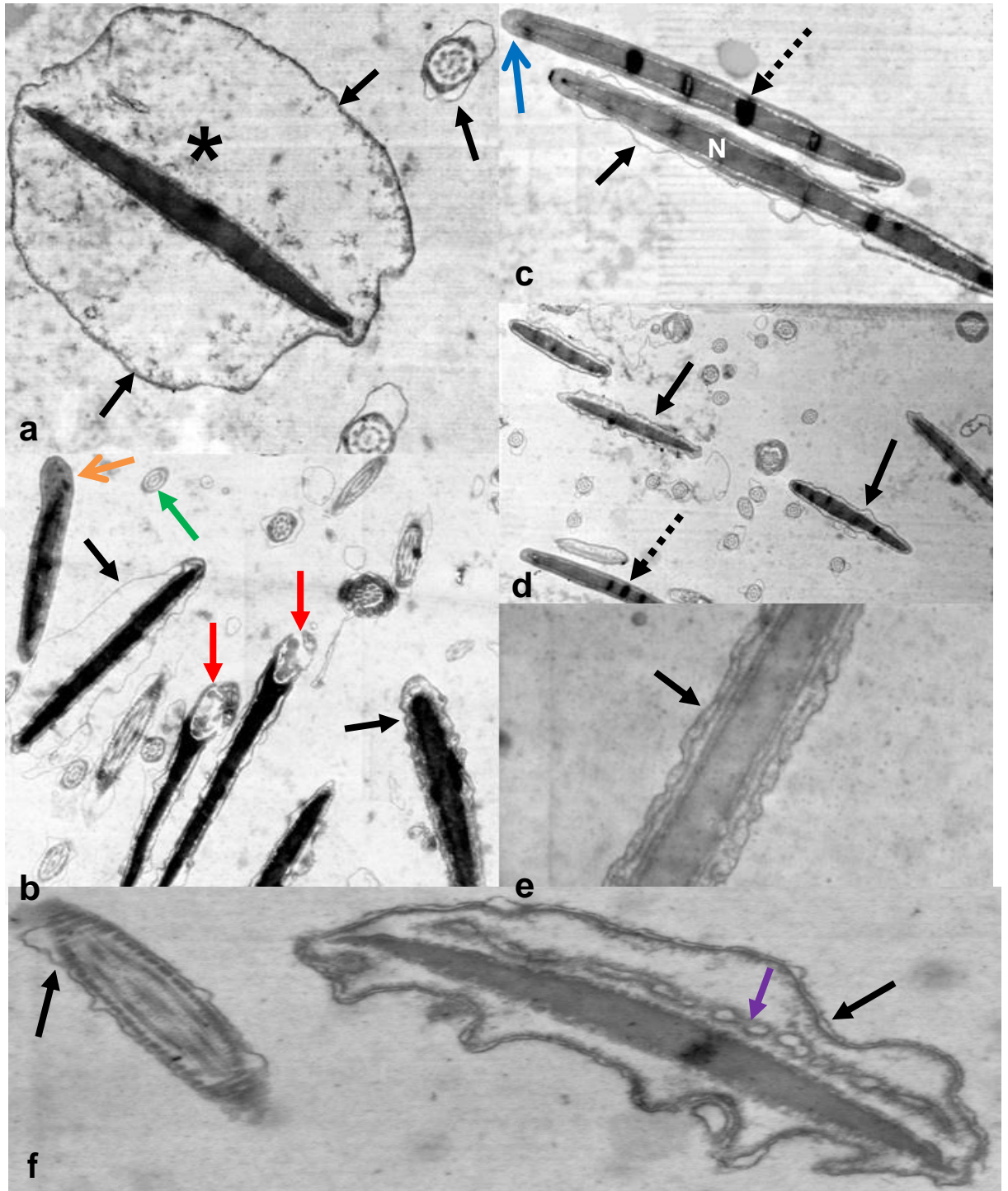
Şekil 6: Spermilerin baş (siyah oklar) ve kuyruk (kırmızı oklar) bölgelerinden geçen boyuna ve enine kesitleri. TB boyama, 1000X

4.2. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları

Elektron mikroskobu mikrograflarında, tüm gruplarda, spermilerin kriyoprezervasyon işlemi sırasında baş, orta ve kuyruk bölgelerinde görülen başlıca ince yapı değişiklikleri aşağıdaki değişiklikler şeklinde gözlenmiştir.

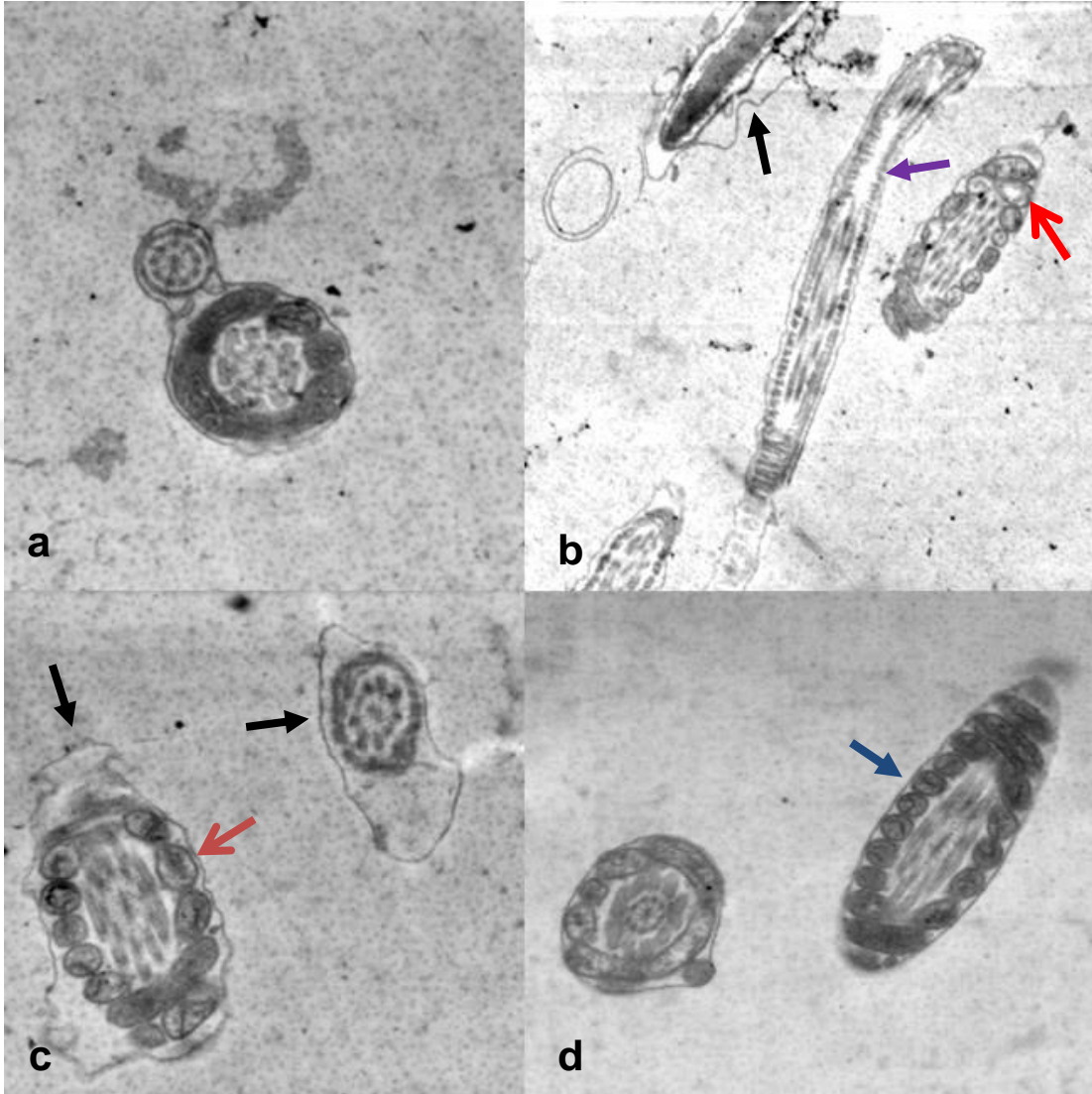
1. Membran deformasyonları
2. Vakuolizasyon
3. Yapısal genişlemeler
4. Birikimler
5. Çift kuyruk
6. Mitokondri, nukleus, akrozom, aksonem hasarlanmaları

1. Temel sulandırıcı + %5 gliserol (Kontrol 1) grubunda; az sayıda normal morfolojide baş ve kuyruk kesitlerine rastlanırken (Şekil 7b, 7c, 7d), akrozom ve plazma membranında deformasyonlar, hasarlanmış baş kısmında nuklear vakuol ile dev membransel vakuol (Şekil 7) ayırt edilmiştir.



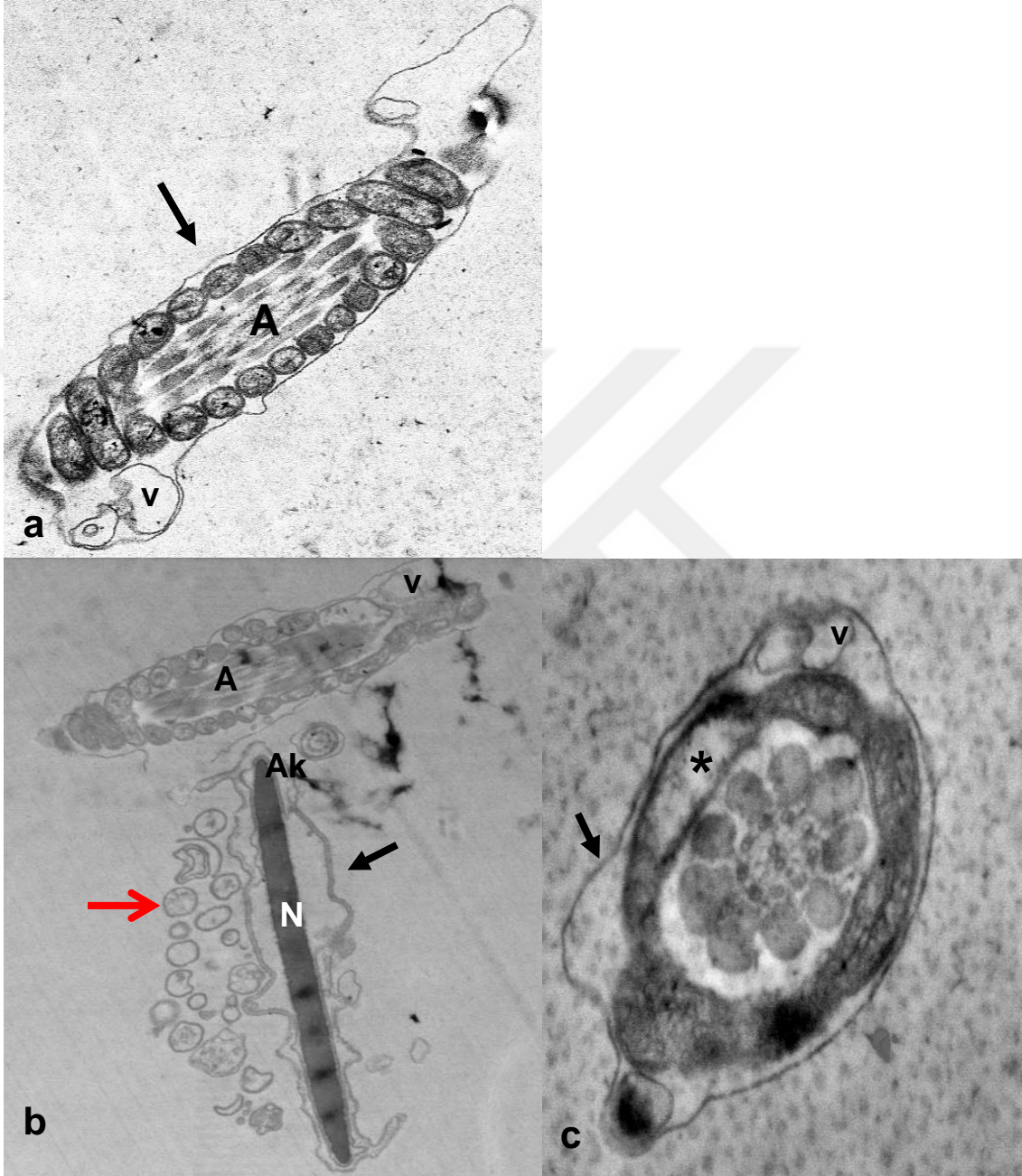
Şekil 7: a) Hasarlı plazma membranı (siyah ok), dev membransal vakuol (*). Orijinal büyütme 52000X. b) Enine geçmiş hasarsız kuyruk (yeşil ok), hasarlı baş kısım-nuklear vakuol (kırmızı ok), akrozoom (turuncu ok) ve membran deformasyonları (siyah ok). Orijinal büyütme 27000X. c) Buz kristalleri (kesikli ok), membran deformasyonu (siyah ok), hasarsız akrozoom (mavi ok). Orijinal büyütme 55000X. d) membran deformasyonu (siyah ok), buz kristali (kesikli ok) olmakla birlikte membran deformasyonu gibi ince yapı değişikliği göstermeyen hasarsız baş (kırmızı ok). Orijinal büyütme 28000X. e) Plazma membran deformasyonu (siyah ok). f) Akrozoom membranında kabarcıklar (mor ok), plazma membranı deformasyonu (siyah ok). Orijinal büyütme 128000X, f: 66000X. N: Nukleus.

2. Temel sulandırıcı + %5 etilen glikol (Kontrol 2) grubunda; membran deformasyonları, çift kuyruk, membran deformasyonları ve mitokondri hasarları ile hasarsız orta bölge ayırt edilmektedir (Şekil 8).



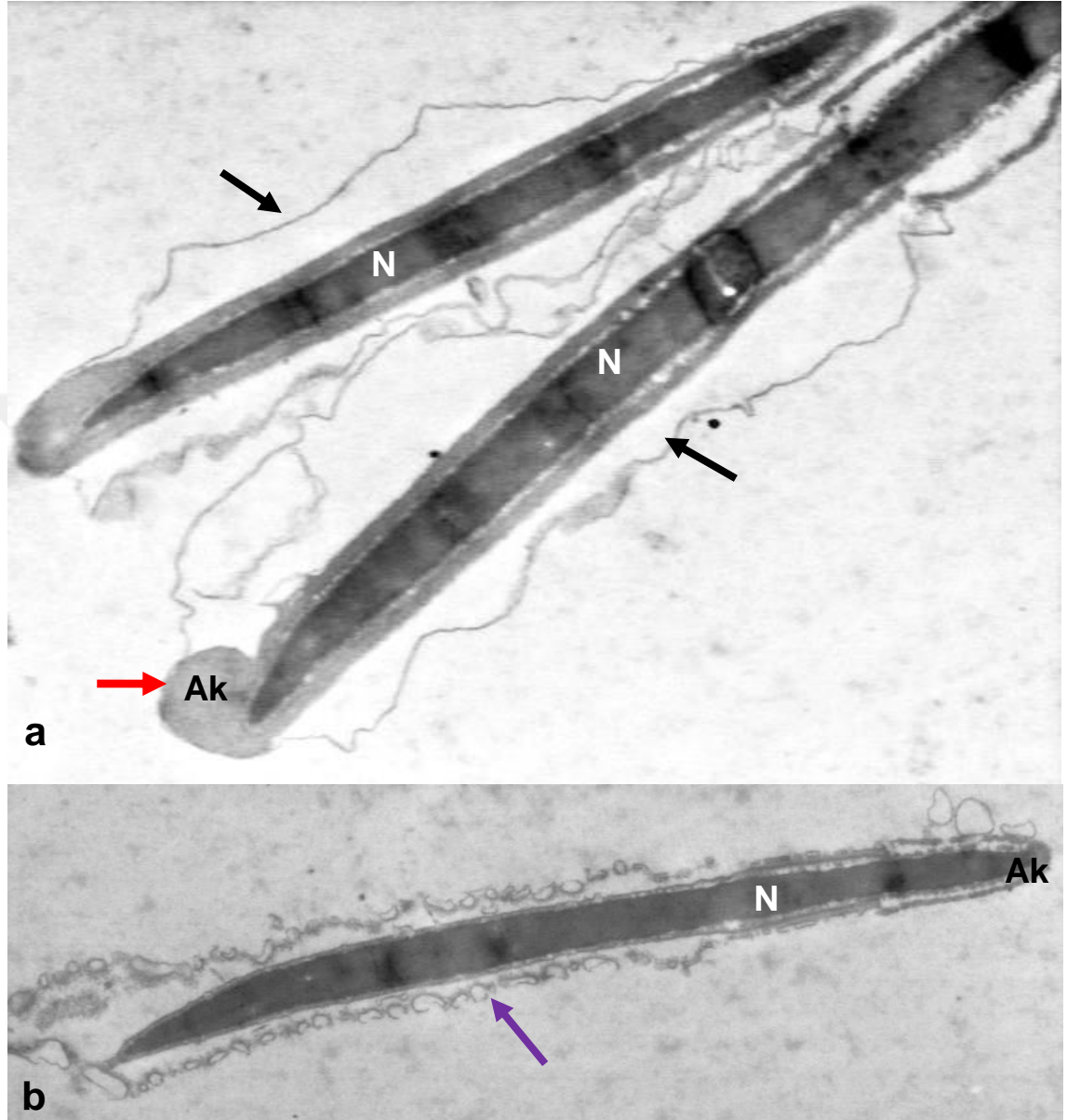
Şekil 8: a) Çift kuyruk. Orijinal büyütme 90000X. b) Membran deformasyonu (siyah ok), hasarlı orta bölge (mor ok), mitokondri hasarları (kırmızı ok). Orijinal büyütme 90000X. c) Membran deformasyonları (siyah ok), mitokondri hasarları (kırmızı ok). Orijinal büyütme 48000X. d) hasarsız orta bölge (mavi ok). Orijinal büyütme 75000X.

3. Temel sulandırıcı + %3 gliserol + 60 mM trehaloz grubunda; mitokondri hasarları, vakuolizasyon, membran deformasyonu gözlenmektedir (Şekil 9).

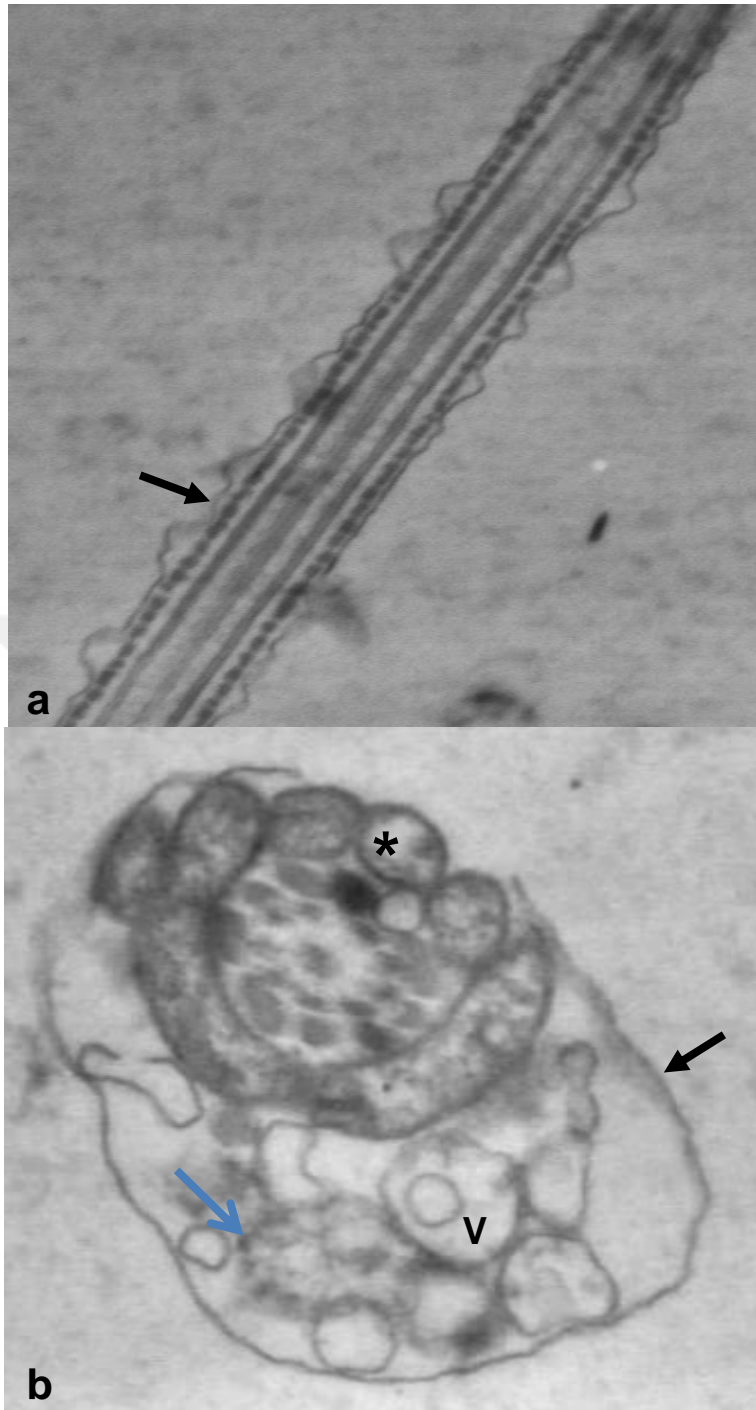


Şekil 9: Hasarlı orta ve baş bölgeleri (a, b, c). Membran deformasyonu (siyah ok), mitokondri hasarları (*), vakuolizasyon (v), membran parçaları (kırmızı ok). Orijinal büyütme; a: 74000X, b: 42000X, c:154000X. Ak: Akrozoim, A: Aksonem, N: nukleus.

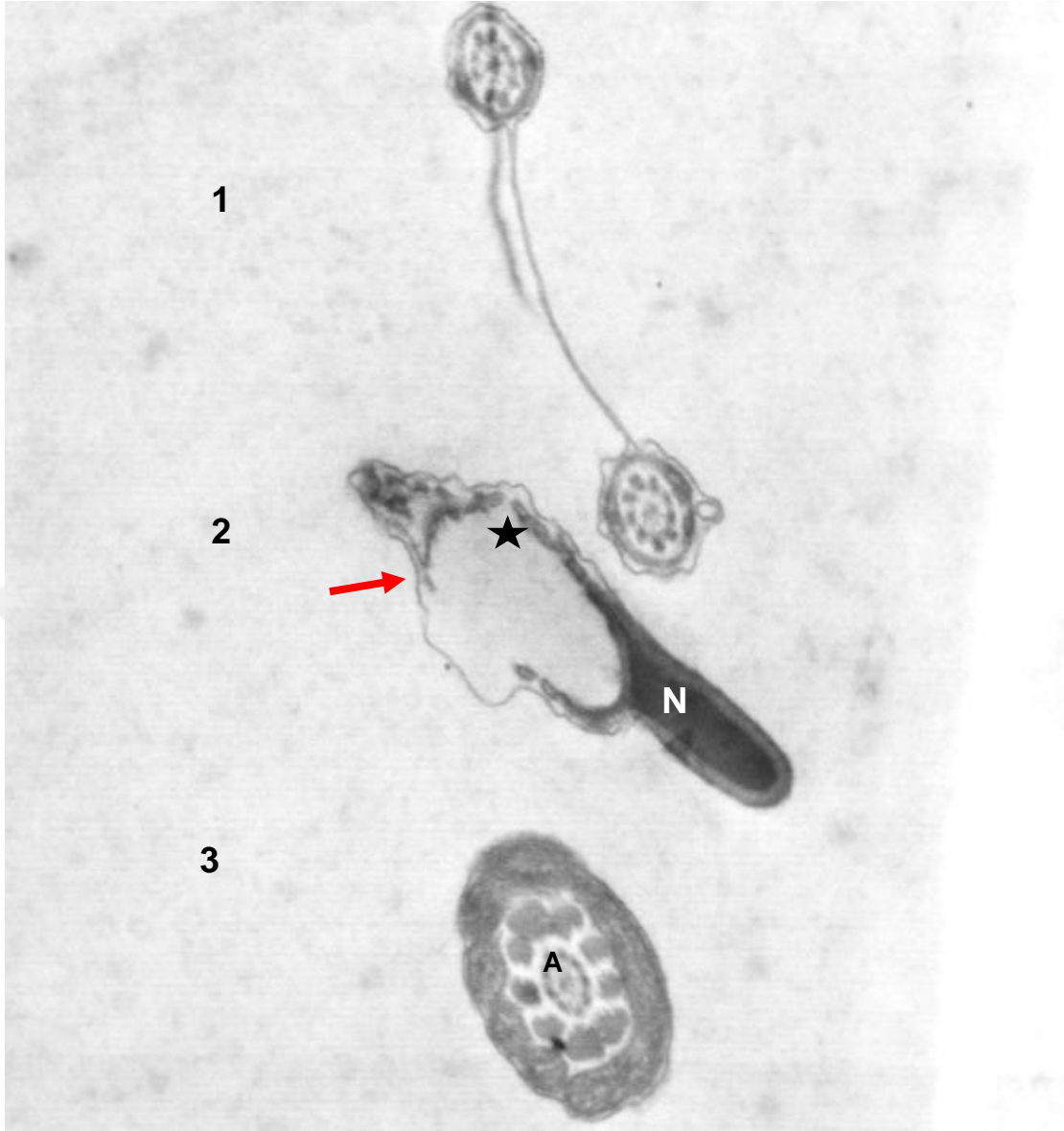
4. Temel sulandırıcı + %1,5 gliserol + 100 mM trehaloz grubunda; membran deformasyonları, akrozomda şişme, vakuolizasyonlar, çift kuyruk, mitokondri hasarları, inkluzyonlar görülmektedir (Şekil 10, 11, 12,13).



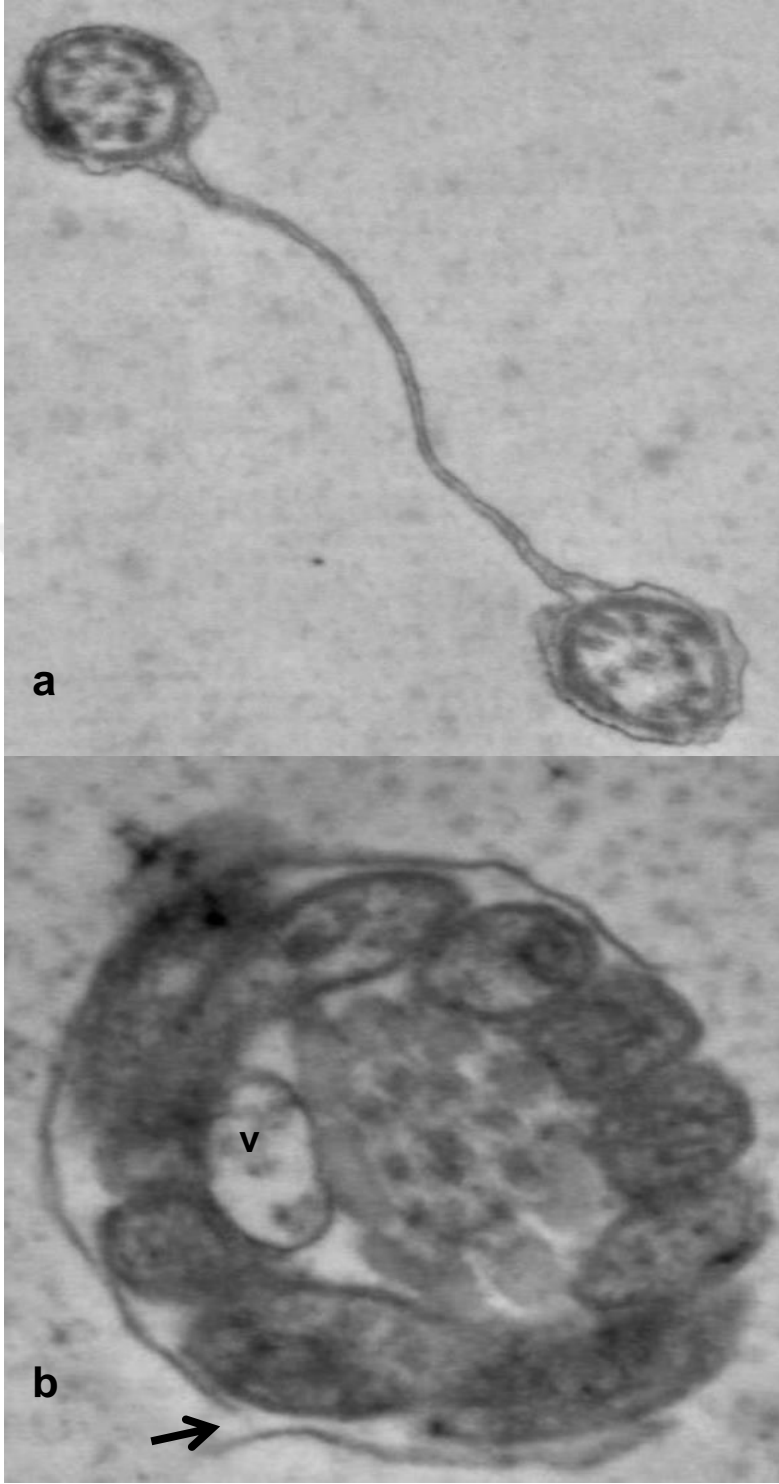
Şekil 10: a) Plazma membran deformasyonları (siyah ok), akrozomda şişme (kırmızı ok). b) kabarcıklı akrozom membranı (mor ok). Orijinal büyütmeler; (a): 37000X, b: 23000X. Ak: Akrozom; N: Nukleus.



Şekil 11: Plazma membran deformasyonları (siyah ok), mitokondri hasarları (*), vakuolizasyon (v), inkluzyonlar (mavi ok) (a, b). Orijinal büyütme; a: 80000X, b: 70000X.

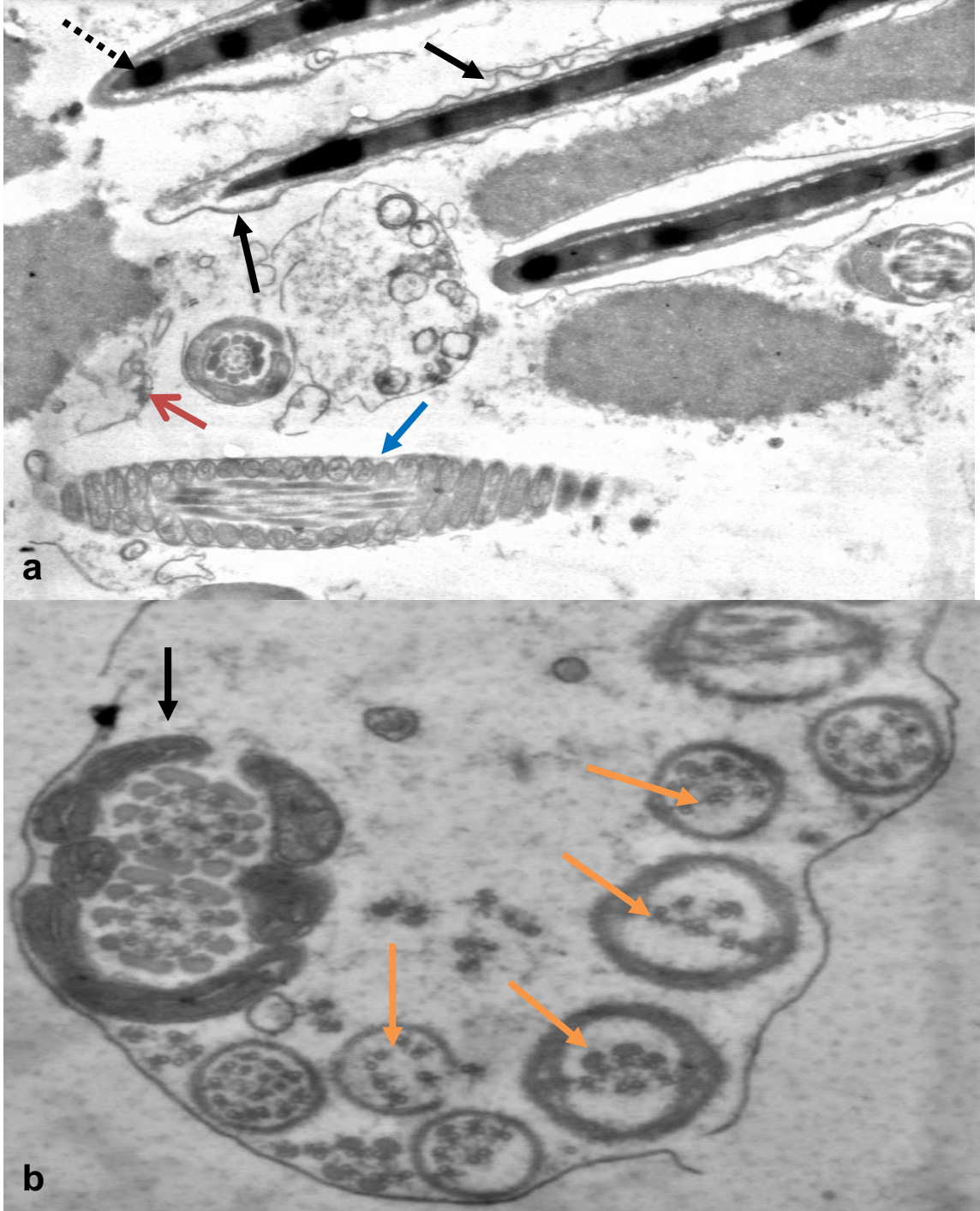


Şekil 12: 1. Çift kuyruk 2. Hasarlı baş kısım (kırmızı ok)-nuklear vakuolizasyon (★) ,
3. Orta bölge enine kesiti. A: Aksonem. N: Nukleus. Orijinal büyütme 48000X.

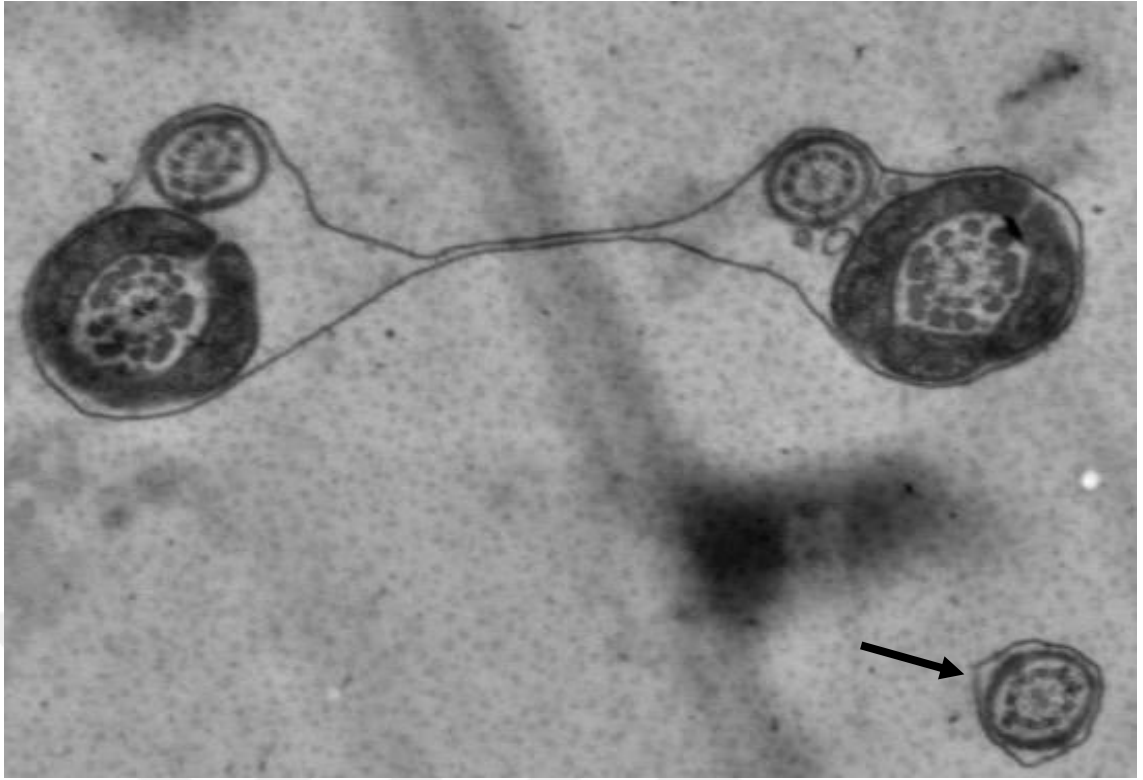


Şekil 13: a) Çift kuyruk, b) Orta bölgede vakuol (v), membran hasarı (siyah ok). Orijinal büyütme 90000X. b: 124000X.

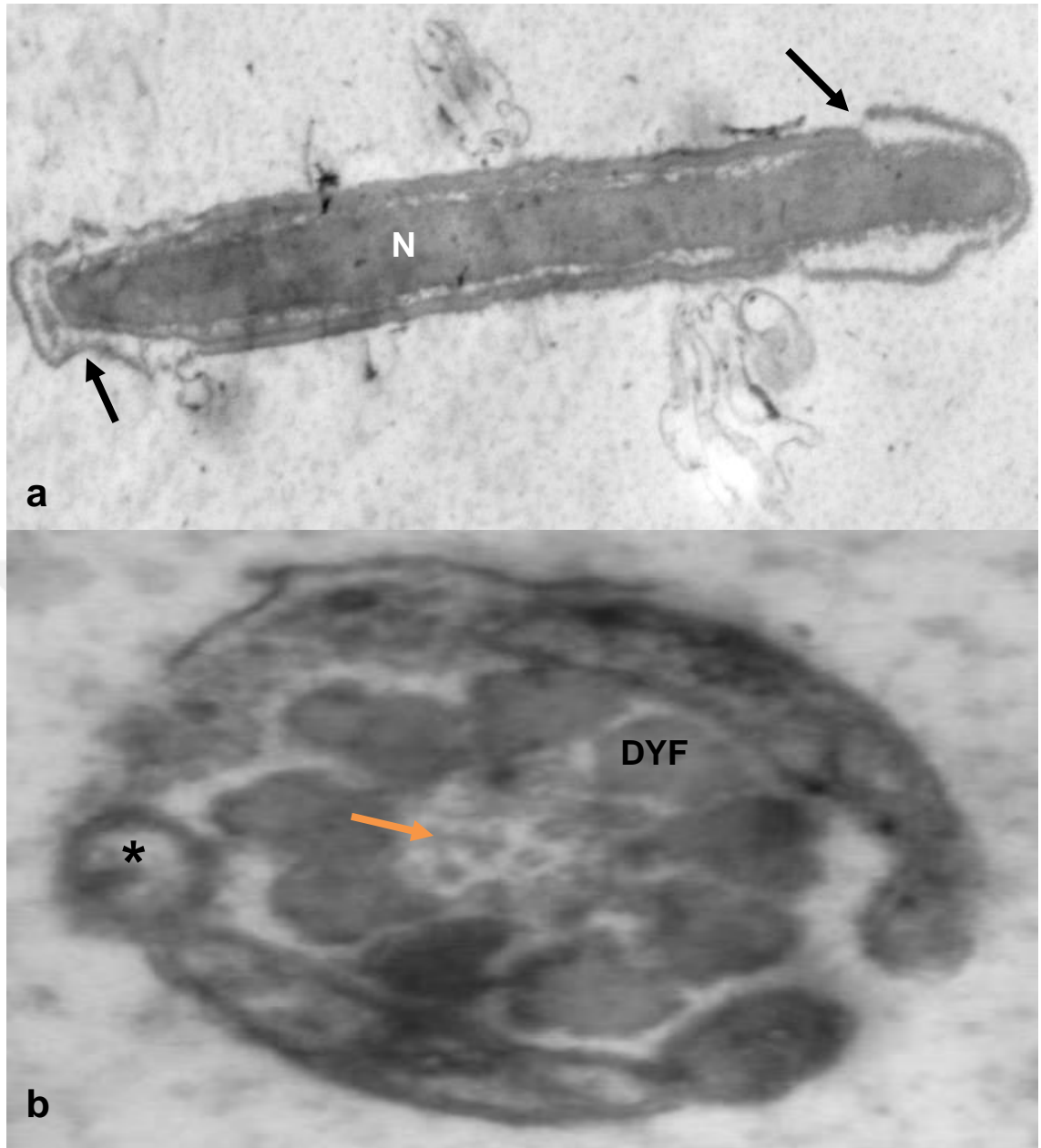
5. Temel sulandırıcı + %3 etilen glikol + 60 mM trehaloz grubunda; plazma membran deformasyonları, hasarsız orta bölge, membran parçaları, çift kuyruk ve aksonem hasarları görülmektedir (Şekil 14).



Şekil 14: a) Plazma membran deformasyonları (siyah ok), hasarsız orta bölge (mavi ok), membran parçaları (kırmızı ok), buz kristali (kesikli ok) b) Çift kuyruk (siyah ok), aksonem hasarları (turuncu ok). Orijinal büyütme a: 40000X, b: 100000X.



Şekil 16: Dört başlı kuyruk ve kuyruk enine kesitinde membran deformasyonu (siyah ok). Orijinal büyütme 50000X.



Şekil 17: a) Membran deformasyonları (siyah ok), b) Mitokondri hasarları (*), aksonem hasarı (turuncu ok). DYF: Dış Yoğun Fibriller, N: Nukleus. Orijinal büyütme; a: 75000, b: 120000X.

4.3. Elektron Mikroskopundan İstatiksel Analiz

Elektron mikroskopunda, 6 gruba ait her bir preparattan sayılan 500 sperm, başlıca membran, aksonem, mitokondri hasarlanmaları gibi deformasyonlar göz önüne alınarak, hasarlı ve hasarsız spermier şeklinde değeriendirilmiştir. Gruplara göre hasar dağılımları arasındaki farklılıklar ki-kare analizi ile incelenmiş ve farklılığın $P < 0,05$ düzeyde olması normal kabul edilmiştir (Tablo1).

İstatiksel analiz sonuçlarına göre, **etilen glikol %5 ile etilen glikol %1,5 + 100 mM trehaloz** uygulamalarının, sperm morfolojisini en iyi koruyan uygulamalar olduğu belirlenmiştir. Trehaloz uygulanan gruplardan hasarsız sperm yüzdesinin yüksek olduğu grubun etilen glikol %1,5 + 100 mM trehaloz (T6) olması, %1,5 etilen glikol içindeki yüksek dozdaki trehalozun kriyoprotektif olarak etkili bir ajan olduğunu ortaya koymuştur.

Gruplar	Hasarlı	Hasarsız	Toplam	Hasarsız Yüzde (%)
Gliserol %5 Kontrol grubu1 (T1)	324	180	504	36 ^e
Gliserol %3 + 60 mM Trehaloz (T2)	305	222	527	42 ^{cd}
Gliserol %1,5 + 100 mM Trehaloz (T3)	335	273	608	45 ^{bc}
Etilen Glikol %5 Kontrol grubu 2 (T4)	334	383	717	53^a
Etilen Glikol %3 + 60 mM Trehaloz (T5)	384	116	500	23 ^f
Etilen Glikol %1,5 + 100 mM Trehaloz (T6)	279	260	539	48^{ab}

Tablo 1: Elektron Mikroskopunda tespit edilen hasarsız sperm yüzdeleri gösterilmiştir. [Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)]

5. TARTIŞMA

Sperm kriyoprezervasyon işlemleri, hücrelerde düşük sıcaklığa bağlı stres ve şiddetli ozmotik değişikliklere neden olur. Kriyoprezervasyonla hücre zarında meydana gelen hasar, birçok hücresel yapıda ve ilişkili işlevlerinde hasarlara yol açar (Mayers 2005). Bunun sonucunda spermlerin fertilizasyon kapasitesi azalır (Nishizono vd 2004; Tunalı 2014). Kriyoprezervasyonun, sperm yapısında çeşitli deformasyonlara yol açtığı bir çok çalışmada gösterilmiştir (Healey 1969; Quinn vd 1969; Barthelemy vd 1990; Nishizono vd 2004; Pesch ve Bergmann 2006; Ozkavukcu vd 2008; López Armengol vd 2012; Přinosilová vd 2012; Shi vd 2014).

Son yıllarda, kriyoprezervasyonun sonucu olarak ortaya çıkan yapısal değişiklikleri en aza indirecek kriyoprotektanların kullanılmasına yönelik yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin, koç'da, kriyoprotektan olarak kullanılan dithioerythritol'ün, sperm hareketliliği üzerinde koruyucu etkisi (Başpınar vd 2011), Tris-yumurta sarısı sulandırıcısına Vit-E (60 µM ve 120 µM) eklenmesinin sperm yapısal bütünlüğü (plazma zarı ve mitokondri) ile kinematığını desteklediği (Silva vd 2013) ortaya konmuştur. Taşdemir vd (2014), boğa'da, kriyoprezervasyonda, sistein'inin plazma membran bütünlüğünü en iyi koruyan kriyoprotektan olduğunu bildirmişlerdir.

Alçay (2015), koç'da kriyoprotektan olarak kullanılan gliserolün, çözdürme sonrası, hareketliliği ve plazma zarının fonksiyonel bütünlüğünü koruduğunu, 1,2 propanediol ve etilen glikol'ün akrozomal bütünlüğü koruduğunu ortaya koymuştur. Çalışmada, gliserolün, sperm motilitesi ve plazma membranı üzerine kriyoprotektif etkisi gösterilmekle birlikte, etilen glikol'ün akrozom bütünlüğünü koruduğunun ortaya konması, çalışmamızla benzerlik göstermiştir.

Büyükleblebici vd (2014), boğa spermlerinde, 25 mM trehaloz ve %3 etilen glikol'ün akrozom morfolojisinde, %3 gliserol'ün zar bütünlüğünde, %5 etilen glikol ve 5 mM sistein'in kromatin hasarlarında kriyoprotektif etkisini ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda, 100 mM olarak kullandığımız trehaloz'un koruyucu etkisinin belirlenmiş olması, olasılıkla konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilir.

Malo vd (2010), domuz spermasının dondurulmasında kriyoprotektan olarak kullanılan trehalozun spermatozoa canlılığını ve in vitro fertilizasyon parametrelerini artırdığını bildirmişlerdir. Uçan (2014), trehalozun bazı çözündürme sonrası spermatolojik parametreler üzerine diğer şekerlere göre daha olumlu sonuçlar ortaya çıkardığını gözlemlemiştir. Gutiérrez-Pérez vd (2009), domuzda, %1 gliserol ve trehaloz (250 mM) karışımının sperm canlılığı ve hareketliliğinde en iyi sonucu verdiğini ortaya koymuşlardır. Tris–sitrik asit–fruktoz–yumurta sarısı sulandırıcısındaki 100 mM trehaloz veya rafinozun, sperm anomalilerini azalttığı ortaya konmuştur (Jafaroghli vd 2011). Ayrıca, koçlarda sperm hareketliliği ve mitokondriyal membran potansiyelinin yumurta sarısı içindeki 100 mM trehalozda, ancak akrozom bütünlüğünün 100-250 mM trehalozda en iyi sonuç verdiği de bildirilmiştir (Athurupana vd 2015). Bu çalışmalarla benzer şekilde, çalışmamızda da, yüksek konsantrasyonda (100 mM) ancak %1,5 etilen glis醇 içindeki trehalozun en iyi kriyoprotektif etkisi belirlenmiştir.

Invitro fertilizasyon sonuçları, %80 laktoz, %80 rafinoz ve %79 trehaloz şekerleri ile dondurulan hibrit fare spermelerinde, %11 gliserol ile dondurmaya göre daha fertil olduğunu göstermiştir (Sztejn vd 2001). Storey vd 1998, trehalozun plazma zarının korunmasında pozitif etki gösterdiğini, gliserol/trehaloz kombinasyonunun da invitro ve invivo olarak döllenmiş yumurta oluşumunu sağladığını bildirilmişlerdir. El-Sheshtawy vd (2015), boğa spermatozoalarının dondurma işleminde, 50-100 mM trehaloz veya sukrozun daha yararlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, Aboagla ve Terada 2003, keçi spermelerinde, hareketlilik parametrelerinin trehaloz konsantrasyonu artışı ile belirgin bir şekilde geliştiğini, Hu vd 2009, domuz spermelerinde, 100 Mm trehalozun, hareketlilik, mitokondriyal aktivite, zar ve akrozom bütünlüğünde yüksek kriyoprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmalar, kriyoprotektif etkisi belirlenen trehalozun artan konsantrasyonlarında etkili olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda da yüksek konsantrasyondaki trehalozun kriyoprotektif etkisinin gösterilmesi bu çalışmalarla uyum sağlamıştır.

Benzer şekilde, Naing vd (2010), keçi spermasının kriyoprezervasyonunda glukoz ve trehaloz kombinasyonunun semen kalitesini artırdığını, 198,24 mM trehaloz'un daha yüksek katkı sağladığını göstermişlerdir. Kriyoprezerve koç spermelerinde, 100 mM trehaloz'un vitE düzeyini belirgin bir şekilde yükselttiği, 50 mM trehalozun çözündürme sonrası hareketlilikte yüksek oran sağladığı, ancak akrozom ve total anomalilerde belirgin bir farklılık olmadığı ortaya konmuştur (Bucak vd 2007). Bu çalışmada, 50 mM trehalozun akrozom ve total anomaliler üzerinde etkisinin olmadığını gösterilmesi, bizim çalışmamızda düşük konsantrasyondaki trehalozun (60 mM) yüksek konsantrasyondaki trehaloz (100 mM) göre daha az kriyoprotektif etki göstermesi sonucu ile uyum göstermiştir.

Bununla birlikte, Uysal ve Bucak (2009) da, 100 mM trehalozun, kriyoprotektan olarak spermelerde hareketlilik, morfolojik anomaliler, canlılık ve membran bütünlüğü bakımından 50 mM trehaloza göre daha üstün olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmalarda yüksek orandaki trehalozun daha fazla koruyucu etkisinin gösterilmesi, bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Ayrıca, Aisen vd (2005), koç sperm kriyoprezervasyonunda, sitrat, tris tamponu, trehaloz ve EDTA uygulamalarında, ultramikroskopi değerlendirmesinde, dondurma-çözdürme sonrası sağlam plazma zarı yüzdesinin trehaloz içeren hipertonic sulandırıcı da belirgin bir şekilde daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Trehalozun kriyoprotektif fonksiyonunun elektron mikroskobu düzeyinde gösterildiği bu çalışmayla benzer şekilde elektron mikroskobu düzeyinde en iyi korumayı sağlayan trehaloz konsantrasyonunu belirlediğimiz bu çalışmamız, literatüre ek katkılar sağlayacaktır.

Alvarenga vd (2000), aygır spermasının dondurulmasında, etilen glikol'ün gliserol ile benzer etki gösterdiğini, %5 etilen glikol'de canlı sperm yüzdesinin en yüksek olduğu, %10 etilen glikol'de canlı spermatozoa'nın belirgin bir şekilde az olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, hasarsız sperm yüzdesi %5 etilen glikol grubunda yüksek bulunmuştur.

Sa-Ardrit vd (2006), fil spermasının kriyoprezervasyonunda, dondurma ve çözdürme işlemlerinin plazma zarı, akrozom ve mitokondrilerde yapısal hasarlara yol açtığını floresan ve elektron mikroskopi tekniklerinin bu konuda güçlü teknikler olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında, TEST+gliserol'de [{5.54% Tes [N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane-sulphonic acid], 1,15% Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, %0,4 glukoz, %20 yumurta sarısı ve %5 gliserol} dondurulan spermelerde yüksek oranda sağlam plazma zarı ve aktif mitokondrilerin olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda, %5 gliserol, %1,5 etilen glikol ile karşılaştırılmış ve %1,5 etilen glikol daha üstün bulunmuştur. Bununla birlikte, ileriki çalışmalarda farklı konsantrasyonlardaki gliserol ve etilen glikol farklı konsantrasyonlardaki kriyoprotektanlarla birlikte kullanılabilir. Böylece en yüksek koruyuculuk sağlayan kriyoprotektif ajan kombinasyonu ve konsantrasyon değerleri belirlenebilir.

Farklı sulandırıcılar içerisinde kullanılan kriyoprotektanların çeşitli fonksiyonları farklı yöntemlerle araştırılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan elektron mikroskobu yöntemleri, spermelerdeki kriyohasarin belirlenmesinde kullanılan tekniklerden biridir. Bu çalışmada, kriyoprotektan olarak farklı konsantrasyonlarda trehaloz kullanılmış ve tüm grupların elektron mikroskobu mikrograflarında spermelerdeki başlıca ince yapı değişiklikleri belirlenmiştir. Bu bulgulara dayanılarak istatistiksel çalışma yapılmış ve trehalozun kriyoprotektif etkisi ince yapı düzeyinde istatistiksel olarak araştırılmıştır. Spermelerde baş, orta ve kuyruk bölgelerinde birçok ince yapı değişiklikleri gözlenmiştir.

Bu değişiklikler başlıca; membran deformasyonları, vakuolizasyonlar, yapısal genişlemeler, çift kuyruk, mitokondri, nukleus, akrozom ve aksonem hasarlanmalarıdır.

İnsan spermasının dondurulmasında, membranlarda, akrozomda ve kuyrukta, keçi spermasının dondurulmasında, hareketlilik ile membran ve mitokondri'de, öküz spermasının dondurulmasında, akrozomal bölgede, koç spermasının dondurulmasında, orta bölgede ve mitokondrial kılıfta hasarlar şeklinde farklı memeli türlerinde birçok çalışma ortaya konmuştur (Pesch ve Bergmann 2006; Ozkavukcu vd 2008; Shi vd 2014; Quinn vd 1969). Çalışmamızda belirlediğimiz, kriyoprezervasyon sonucu meydana gelen ince yapı değişiklikleri, yukarıda belirtilen farklı memeli türlerinde gösterilen bazı sperm ince yapı değişiklikleri ile benzerlik göstermiştir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak; akrozom yapısında bozulma, vezikül oluşumu, yapısal genişlemeler, birikimler, çift kuyruk, mitokondri, nukleus, akrozom, aksonem hasarlanmaları ve boyun bölgesinde hasarlar gözlenmiştir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, geçirimli elektron mikroskobu teknikleri ile kriyoprezervasyon'dan kaynaklanan sperm ince yapı kriyohasarlari ve bu hasarlar üzerine trehalozun kriyoprotektif etkisi araştırılmıştır.

A) İnce yapı değişiklikleri

Spermelerde ayırt edilen başlıca ince yapı değişiklikleri aşağıda belirtilmektedir:

1. Membran deformasyonları
2. Vakuolizasyon
3. Yapısal genişlemeler
4. Çift kuyruk
5. Mitokondri, nukleus, akrozom, aksonem hasarlanmaları

B) İstatistiksel analiz

Spermatozoon ince yapı değişiklikleri göz önüne alınarak elektron mikroskopunda her gruptan kriyohasarlari spermeler sayılmış ve istatistiksel analizi yapılmıştır. Buna göre, % 5 etilen glikol ve %1.5 etilen glikol + 100 mM trehaloz içeren gruplarda en yüksek kriyoprotektif etki saptanmıştır.

Sonuç olarak: türlerin sağlıklı genetik soylarının sürdürülebilirliği için uygulanan kriyoprezervasyon işlemlerinde hücrelerde meydana gelen kriyohasarlari önlenmesi amacıyla kullanılan kriyoprotektanların etkilerinin araştırılmasının önemi göz önüne alındığında, bu çalışmanın literatüre önemli ek katkılar sağlayacağı ileri sürülebilir.

7. KAYNAKLAR

Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biol of Reprod** 2003; 69, 1245-1250.

Afzelius BA. Electron microscopy of the sperm tail; results obtained with a new fixative. **J Biophys Biochem Cytol** 1959; 5(2):269-278.

Afzelius BA, Dallai R, Lanzavecchia S, Bellon PL. Flagellar structure in normal human spermatozoa and in spermatozoa that lack dynein arms. **Tissue Cell** 1995; 27(3):241-247.

Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology** 2000; 53(5): 1053-1061.

Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology** 2002; 57(7): 1801-1808.

Aisen EG, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology** 2005; 50(3): 239-249.

Alçay S. Hücre İçine Girebilen Bazı Kriyoprotektanlarla Dondurulan Koç Spermasının *In Vitro* Embriyonik Gelişim Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, **Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Bursa, 2015, sf. 85.

Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Vet J** 2000; 32(6): 541-545.

Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biol Reprod** 2002; 66(2):354-360.

Ateşşahin A, Bucak MN, Tuncer PB, Kizil M. Effects of antioxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze thawing process. **Small Ruminant Research** 2008; 77(1): 38-44.

Athurupana R, Takahashi D, Ioki S, Funahashi H. Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa. **J Rep Dev** 2015; 61(3): 205-210.

Baccetti B, Afzelius BA. The biology of the sperm cell. **Monogr Dev Biol** 1976; (10): 1-254.

Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potencial. **J Androl** 2001; 22(6):1061–1069.

Barthelemy C, Royere D, Hammah S, Lebos C, Tharanne MJ, Lansac J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. **Arch Androl** 1990; 25(1): 29-40.

Başpınar N, Çoyan K, Bucak MN, Tuncer PB. Effects of dithioerythritol on ram semen after the freeze-thawing process. **Cryobiology** 2011; 63(3): 152-156.

Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology** 2012; 78(8):1682-1699.

Bowen RH. The acrosome of the animal sperm. **Anatom Rec** 1924; 28, 1–13.

Bucak M, Tekin N. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. **Ankara Üniv Vet Fak Derg** 2007; 54, 67-72.

Bucak MN. Ankara Tekesi Spermasının Dondurulmasında Bazı Kriyoprotektanların Etkisi. Doktora Tezi, **Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 2007, sf.56.

Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı A, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology** 2007; 67(5):1060–1067.

Büyükleblebici S, Tuncer PB, Bucak MN, Eken A, Sarıözkan S, Taşdemir U, Endirlik BÜ. Cryopreservation of bull sperm: effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. **Anim Reprod Sci** 2014; 30;150(3-4):77-83.

Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction** 2001;121(3):395-401.

Chen Y, Foote RH, Brockett CC. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine and blood serum on survival of frozen bull sperm. **Cryobiology** 1993; 30(4): 423-431.

Cirit Ü, Bağış H, Demir K, Ağca C, Pabuccuoğlu S, Varışlı Ö, Clifford-Rathert C, Ağca Y. Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. **Anim Reprod Sci** 2013; 139(1-4):38-44.

Çoyan K, Ataman MB, Kaya A, Karaca F. Evcil Hayvanlarda Döllerme ve Suni Tohumlama. **Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi**, Konya, 2002.

Dym M, Fawcett DW. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. **Biol Reprod** 1971; 4 (2), 195-215.

Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microsc Res Tech** 2003; 1;61(1):103-115.

El-Sheshtawy RI, SisyWalid GA, El-Nattat S. Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. **Asian Pacific Journal of Reproduction** 2015; 4(1): 26-31.

Fawcett DW, Philips DM. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. **Anat Rec** 1969; 165(2): 153-164.

Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. **Dev Biol** 1975; 44(2): 394-436.

Fiser PS, Fairfull RW. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoon frozen in straws. **Cryobiology** 1984; 21, 542-551.

Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR J** 2000; 41(4):187-196.

Gibbons IR, Grimstone AV. On flagellar structure in certain flagellates. **J Biophys Biochem Cytol** 1960;7: 697-716.

Gillan L, Maxwell WM. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **J Reprod Fertil Suppl** 1999; 54:271-283.

Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda ML, Carvajal SU, Ortega MET. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. **Cryobiology** 2009; 58, 287-292.

Healey P. Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. **J Reprod Fert** 1969; 18: 21-27.

Holstein AF, Roosen-Runge EC. **Atlas of Human Spermatogenesis**. Grosse Verlag, Berlin, 1981.

Holstein AF, Roosen-Runge EC, Schirren C. 1988. **Illustrated Pathology of Human Spermatogenesis**. Berlin, 1988.

Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Yang H, Zhang SS, Zhao HW. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. **Reprod Domest Anim** 2009; 44(4): 571-575.

Irons MJ, Clermont Y. Kinetics of fibrous sheath formation in the fact that the outer mitochondrial membrane becomes the rat spermatid. **Am J Anat** 1982; 165, 121-130.

Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research** 2011; 96, 58-63.

Junqueira LC, Carneiro J. **Temel Histoloji, Text & Atlas, Nobel Tıp Kitapevleri**, İstanbul, 2009, s.436.

Kuehnel W. **Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy**. Thieme, New York, 2003, s. 386-387.

Liu Z, Foote RH, Brockett CC. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. **Cryobiology** 1998; 37, 219– 230.

López Armengol MF, Jurado SB, Pelufo V, Aisen EG. A quantitative ultramorphological approach for systematic assessment of sperm head regions: an example in rams. **Cryobiology** 2012; 64(3): 223-234.

Malo C, Gil L, Gonzalez N, Cano R, de Blas I, Espinosa E. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. **Cryobiology** 2010; 61(1):17-21.

Mayers SA. Spermatozoal response to osmotic stress. **Anim Reprod Sci** 2005; 89: 57-64.

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am J Physiol** 1984; 247:125-142.

McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP. Fertilization and early embryology: Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. **Hum Reprod** 1995;10(5):1163-1171.

Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Hum Reprod** 1997; Update 3, 403–439.

Naing SW, Wahid H, Mohd Azam K, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Anim Reprod Sci** 2010; 122, 23–28.

Noiles EE, Bailey J, Storey BT. Temperature dependence of the water permeability, LP of murine sperm shows a discontinuity between 4°C and 0°C. **Cryobiology** 1995; 32, 220-238.

Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T, Nakagata N. Decrease of Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa after Freezing and Thawing Is Related to Cellular Injury. **Bio of Reprod** 2004; 71(3): 973-978.

O'Connel M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Hum Reprod** 2002; 17(3):704-709.

Oko R, Clermont Y. Light microscopic immunocytochemical study of fibrous sheath and outer dense fiber formation in the rat spermatid. **Anat Rec** 1989; 225(1):46-55.

Olson GE, Hamilton DW, Fawcett DW. Isolation and characterization of the fibrous sheath of rat epididymal spermatozoa. **Biol Reprod** 1976;14(5):517-530.

Olson GE, Linck RW. Observations of the structural components of flagellar axonemes and central pair microtubules from rat sperm. **J Ultrastruct Res** 1977; 61(1):21-43.

Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. **J Assist Reprod Genet** 2008; 25(8): 403–411.

Öztürkler Y. Koç spermasının yoğun gliserollü sulandırıcılarla dondurulması ve eritme sonrası fertilité üzerine etkileri. Doktora Tezi. **İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 1996, s.85.

Palasz AT, Mapletopt RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotec Advan** 1996;14(2):127-149.

Pedersen H, Lebech PE. Ultrastructural changes in the human spermatozoon after freezing for artificial insemination. *Fertil Steril* 1971; 22(2):125-133.

Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 2006; 37(7): 597–612.

Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 2007; 74(7):878-892.

Piasecka M, Kawiak J. Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; 41, 125–139.

Přinosilová P, Sedláčková M, Kopecká V, Hlavicová J. Boar sperm head membrane damage during cryopreservation evaluated by electron microscopy. *Research in pig breeding* 2012; 6: 2.

Purdy PH. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 degrees C prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2006; 93(1-2):114-123.

Quinn PJ, White IG, Cleland KW. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil* 1969; 18(2):209-20.

Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(7):871-898.

Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Palme Yayıncılık, Ankara, 2014, s.796.

Rovan E. Biochemistry of spermatozoa. In: Busch, W., Holzmann, A. (Eds.), Physiology and Pathology of Reproduction in Male Animals. *Veterinary Medicine Andrology*, Schattauer, Stuttgart. 2001; pp. 23–54.

Sa-Ardrit M, Saikhun J, Thongtip N, Damyang M, Mahasawangkul S, Angkawanish T, Jansittiwate S, Faisaikarm T, Kitiyanant Y, Pavasuthipaisit K, Pinyopummin A. Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Int J Androl* 2006; 29 (2): 346-52.

Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 1995; 38(1-2): 1-36.

Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 77–111.

Shi L, Ren Y, Zhou H, Hou G, Xun W, Yue W, Zhang C, Yang R. Effect of rapid freezing-thawing techniques on the sperm parameters and ultrastructure of Chinese Taihang black goat spermatozoa. *Micron* 2014; 57: 6-12.

Soltanpour F, Moghaddam G. Effects of frozen diluents on storage of ram sperm. **International journal of Advanced Biological and Biomedical Research** 2013; 12(1): 1698-1704.

Storey BT, Noiles EE, Thompson KA. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology** 1998; 37(1): 46–58.

Sussman AS, Lingappa BT. Role of trehalose in ascospores of neurospora tetrasperma. **Science** 1959; 130(3385): 1343.

Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. **Reprod Dom Anim** 2015; 50(3): 20–26.

Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Vidal AH, Soares PC, Guerra MMP. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. **Anim Reprod Sci** 2012; 132: 155-158.

Silva SV, Soares AT, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MM. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Anim Reprod Sci** 2013; 137(1-2):37-44.

Sztejn JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE. Comparison of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation. **Cryobiology** 2001; 41, 28–39.

Taşdemir U, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Özgürtaş T, Durmaz E, Büyükleblebici O. Effects of Various Antioxidants on Cryopreserved Bull Sperm Quality. **Kafkas Univ Vet Fak Derg** 2014; 20(2): 253-258.

Tonieto RA, Goularte K., Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia Jr Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. **Small Ruminant Research** 2010; 93, 206-209.

Töpfer-Petersen E, Waberski D., 2001. Sperm maturation and fertilization. In: Busch, W., Holzmann, A. (Eds.), *Veterinary Medicine Andrology, Physiology, Pathology of Reproduction in Male Animals*. Schattauer, Stuttgart, pp.69–72.

Tunalı, G. Sperm kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü. **Androloji Bülteni Dergisi** 2014; 16:123-128.

Uçan U. Fruktoz, trehaloz ve sükröz içeren tris bazlı sulandırıcıya kolesterol yüklü siklodekstrin (CLC) ilavesinin koç spermasının dondurulabilirlik ve çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek lisans Tezi, **Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Aydın, 2014, s.48.

Uysal O, Bucak MN. The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen. **Ankara Üniv Vet Fak Derg** 2009; 56, 99-103.

Valcarce DG, Cartón-García F, Riesco MF, Herráez MP, Robles V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. **Andrology** 2013; 1(5):723-730.

Warner FD. Crossbridge mechanisms in ciliary motility. In: Book, Goldman RD, Pollard TD, Rosenbaum JL. (Eds), **Cell Motility Cold Spring Harbor Laboratory**, New York, 1976, s.891–914.

Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev** 1995; 7(4): 871–891.

Woelders H, Matthijs A, Engel B. Effects of Trehalose and Sucrose, Osmolality of the Freezing Medium, and Cooling Rate on Viability and Intactness of Bull Sperm after Freezing and Thawing. **Cryobiology** 1997; 35, 93–105.

Yamashiro H, Narita K, Sugimura S, Han YJ, Sugawara A, Morohaku K, Nakazato F, Cono T, Yoshida M, Sato E. Trehalose enhanced the freezability of poodle dog sperm collected by an artificial vagina (AV). **Anim Reprod Sci** 2007; 102: 165-171.

Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology** 2016; 85(1): 47–64.

Yeste M, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. **Mol Reprod Dev** 2017; 84(9): 802-813.

8. ÖZGEÇMİŞ

03.03.1989 tarihinde Salihli'de dünyaya gelen Cennet ERDOĞAN, lise öğrenimini İzmir Özel Türk Koleji'nde tamamladı. 2014 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü bitirdi. 2015 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Rusça ve İngilizce bildiği yabancı dillerdir.

