

Derleme / Review

Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki

Mustafa Numan BUCAK, Necmettin TEKİN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara.

Özet: Gamet hücrelerinin dondurulmasında kullanılan koruyucu maddeler (kryoprotektanlar) soğuk şoku ve donma esnasında gelişen diğer hasarlara karşı koruma sağlarlar. Kryoprotektanların hücrede toksik etkiye sahip olmaları, bu maddeler üzerindeki çalışmaları yoğunlaştırmış, ortama katılan eksternal kryoprotektanlarla, toksik etkiler azaltılmaya çalışılmıştır. Kryoprotektanların optimum katım oranları türe özgü olmakta ve bazı hücre membran parametrelerinin bilinmesini gerektirmektedir. Dondurulan-çözdürülen hücrelerin fizyolojik ve fonksiyonel özelliklerinin anlaşılması ile kryobiyojik çalışmalarda gelişme sağlanmıştır.

Anahtar sözcükler: Gamet hücresi, kryoprezervasyon, kryoprotektan, kryoprotektif etki.

Cryoprotectants and cryoprotective effect in cryopreservation of gamete cells

Summary: Cryoprotectants used in freezing of gamete cells provide protection from cold shock and the other damages during freezing. Due to toxic effects of cryoprotectants, studies about them have been concentrated on it, and toxic effects have been tried to reduce by external cryoprotectants added. Optimum adding rates of cryoprotectants become peculiar to species and require determination of some parameters of cell membrane. Determinating of physiological and functional traits in cryopreserved-thawed cells have provided progress in cryobiological studies.

Key words: Cryopreservation, cryoprotectant, cryoprotective effect, gamet cell.

Giriş

Bilimsel ve modern anlamda canlı hücre dondurma çalışmaları, 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının gliserolün kryoprotektan (soğuk şokuna karşı koruma sağlayıcı) özelliğini bulmasından sonra başlamış, ilk dondurulan hücre spermatozoon olmuştur. Bu anlamda, kryobiyojik hücre, doku, organ ve organizmaların dondurulmasını inceleyen bilim dalı olarak önemini artırmış ve dondurulan-çözdürülen hücrenin fizyolojik-fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılması, kryobiyojijiyi yönlendirmiştir (23, 36).

Spermatozondaki membransel yapılar (plazma membranı, dış akrozomal membran ve mitokondri membranı) ile oosit-embriyo membranı, donma/çözünme işlemine karşı son derece duyarlıdır. Membran yapıları akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitlerle bezeli iki sıralı fosfolipit katmanından oluşmuştur. Bu yapıların termodinamik özellikte ve yüzde 65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden (yağ asidi) oluşması, membranların soğutulmalarının sonucu olarak irreversibl faz değişimine, sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmaktadır (46, 47). Gelişen faz değişimi membran içi enzimlerinin kinetiğinde değişime yol aç-

arak, çözüm sonu canlılığını azaltmaktadır. Bu değişimler sonrası oluşan stabilizasyonun bozulmasıyla da hücrede soğuk şoku gelişmekte, bu durum terminolojide soğutma zararı (cryoinjury) olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca membranların doymamış fosfolipitlerce zengin olması, lipit peroksidasyonuna karşı duyarlılığı doğurmakta, hücrelerin kısa ya da uzun süreli saklanması sırasında hücresel zararı şekillendirmektedir (17, 18, 46). Oosit ve embriyodaki zarar ise, sitoplazmanın ve sitoplazmik membranın fazla oranda lipit içermesinden dolayı donma-çözünme işlemine duyarlı olmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, sitoplazmalarında miyotik ağları oluşturan mikrotubul ve mikrofilamanlar, ortamdaki düşen sıcaklığın etkisiyle destabilize hale gelerek soğuk şoku zararını doğurmaktadır (23, 28, 33). Hücrenin soğutulması esnasında kaçınılmaz olan membransel faz değişiminin stabilizasyonu yönündeki çalışmalar halen sürmektedir (17).

Kryoprotektanlar

Kryoprotektanlar hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına, intrasellüler kristal oluşumuna, çözüm esnasında dekristalizasyona ve gelişen membransel destabilizasyona karşı koruyucu amaçlı

olarak kullanılır. Genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak gösterirler. Hücre, dondurulmadan önce kryoprotektanlarla inkubasyona tabi tutularak, intrasellüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Kryoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküller ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında oluşmasıdır (33, 36).

Hücrelerin başarıyla dondurulması, plazma membranından suyun ve kryoprotektanların basit difüzyonunu ve hızlı transportunu gerektirir. Son yıllarda membranda transport işlevli protein yapısında olan su kanalları (aquaporin) saptanmıştır. Bu proteinlerin dondurma sıvısına katılmasıyla hücrenin yaşam gücü artırılmaktadır (14).

Hücre dondurma mediumundaki kryoprotektanların toksisitesini azaltmak için, hücrelerin kryoprotektanlara maruz kalma süresinin kısaltılması ve permeabl özelliği olmayan kryoprotektanların kullanımı gibi uygulamalar yapılmaktadır (24). Kryoprotektanlar işlevsel olarak iki gruba ayrılmaktadır. 1- Permeabl kryoprotektanlar, 2- Permeabl olmayan kryoprotektanlar.

Permeabl (internal) kryoprotektanlar

Permeabl özelliğe sahip kryoprotektan olarak gliserol, etilen glikol, formamide, Dimetilsülfoksit (DMSO) örnek olarak sayılabilir. Bu tür kryoprotektanlar etkilerini, hücre zarından içeriye girerek ve 'colligative' olarak göstermektedir. Koruyucu etkileri donma esnasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (18, 22, 23, 28).

Gliserol: Gliserol yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir polioller bileşiğidir. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması onun spermatozon üzerine olan etkisini artırmaktadır. Gliserolün toksisitesi, metabolik dönüşümünde oluşan methilglycosal tarafından oluşturulur. Gliserolün toksik etkisi türe bağımlılık göstermekte; aygır, tavşan, kanatlı ve balık spermaları için fertilizasyonda kontraseptif özellik göstermektedir. Hücrelerde gliserolün toksik etkisi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese yol açmasıyla kendini göstermektedir (1, 21, 49).

Ruminant ve primat spermasının dondurulmasında gliserolün katım oranı %4-8, aygırlarda ise %4-5'dir. Domuzda gliserol oranı %3'ü, farede ise %1,75'i geçtiğinde şiddetli akrozomal yıkımın olduğu bildirilmiştir (17, 21, 30).

Etilen glikol: Bir çok türün spermasında donma-çözüm esnasında oluşan zarara karşı etilen glikol, gliserolle eşit oranda etki sağlamaktadır. Etilen glikol at embriyosunun dondurulmasında %6, spermasının dondurulmasında 2 M oranında kullanıldığında gliserole göre

daha az toksik etki gösterir. Sığır embriyolarının dondurulmasında ise toksik etkisi oluşmamaktadır (1, 2, 5).

Amid türevi kryoprotektanlar: Amid türevi kryoprotektanlar (formamid, dimetilasetamid (DMA vb.) özellikle aygır spermasının dondurulmasında gliserole göre daha iyi koruma vermekte ve daha az kontraseptif özellik göstermektedir. Sulandırıcılara %3,5-5 oranında katılması, donma zararına karşı etkili olmakta, çözüm sonu parametrelerde iyileşme sağlamaktadır. Amidler, gliserole duyarlı türlerin (tavşan, alabalık, kanatlı) spermalarının dondurulmasında alternatif olarak gözükmetedir (2, 16).

DMSO (Dimetilsülfoksit): DMSO, kimyasal olarak bir polar kök etrafında iki apolar baştan oluşan amfipatik bir bileşiktir. Bu özellik ona hem sıvı hem de organik medyumalarda çözünme imkanı sağlamaktadır. Kanatlı sperması için en toksik kryoprotektanın DMSO olduğu, en az toksik etkiyi ise gliserol ile DMA'nın (dimetilasetamid) verdiği bildirilmiştir (7, 13). Tavşan ve alabalık spermasında çözüm sonu en yüksek motilite oranı, sulandırıcıya %10-15 oranında katılan DMSO'ten alınmıştır (43, 45). Gliserol ve DMSO'in alabalık embriyosunun dondurulmasında embriyonun her tarafına yayılmadığı görülmüştür (11).

Permeabl (eksternal) kryoprotektanlar

Eksternal kryoprotektanlar, membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranları esnek hale getirir. Ayrıca, hücrede donma/çözünme esnasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Sulandırıcıya ilavelerinde düşük oranda permeabl kryoprotektan kullanılmakta, bu işlem internal kryoprotektanların olası toksik etkilerini azaltmaktadır (4, 6). Eksternal kryoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır.

Makromoleküller: Makromoleküllerinden en çok kullanılanları şunlardır: Polietilen glikol, ficoll 70, BSA, dekstran, mannitol ve polivilinilprolidon'dür. BSA (bovine serum albumin)'nin lipit peroksidasyon inhibitörü olduğu düşünülmektedir (6, 19, 28).

Sakkaritler: Sakkaritlerden glukoz, sükröz, trehaloz ve rafinoz sayılabilir. Sakkaritler, lethal etkili intrasellüler kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar. (3, 29, 37). Şekerler donma ve çözüm esnasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak koruma sağlamakta ve çözüm işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir (28, 29)

Memeli embriyosunun dondurulmasında sükrözün katım oranı 0,25-0,5 M'dir (27). Boğa sperma sulandırıcısına 0,05 M sükröz ilavesi spermayı payette dondurmada koruyucu etki yapmaktadır (8). Tavşanlarda ise sperma sulandırıcısına katılan 0,1 M sükröz ve 1,75 M

DMSO çözüm sonu motilitesi ve akrozom bütünlüğünde en iyi oranı vermiştir (45). Teke spermasının dondurulmasında da, %5 oranında gliserol ve %2-6 oranında laktoz içeren sulandırıcının en az akrozom anomalisine yol açtığı görülmüştür (39).

Fare spermasının dondurulmasında ise kullanılan bazı sulandırıcılar şunlardır: %18 rafinoz + %1,75 gliserol (PBS yada %0,86 NaCl'de hazırlanmış), 0,3 M rafinoz + 0,2 M gliserol + yumurta sarısı (PBS'de hazırlanmış) ve %18 rafinoz + %3 yağsız süt (suda hazırlanmış) (3, 40, 41).

Standart metod (Ekilibasyonlu yavaş dondurma) ile embriyoların dondurulmasında kryoprotektif ajanlar düşük oranlarda (~1,5 M = %10) katılmaktadır (20, 22). Oosit ve embriyoların dondurulmasında kryoprotektif ajanların yüksek yoğunlukta (> %40 = ~6-8 M) kullanılması vitrifikasyon işlemi gerektirmektedir. Vitrifikasyonla dondurulan embriyolardan sığırlarda %40-55, koyunlarda %52 oranında gebelik sağlanmaktadır (4, 12, 33).

Başarılı bir vitrifikasyon işlemi, iyi permeabilite özelliklerine sahip düşük toksisiteli kryoprotektanların kullanımını, kryoprotektanların ortama çok adımda ilavesini, hücre dondurma işleminin düşen sıcaklıklarda yapılmasını ve hücrede oluşacak yapı yıkımlarını önlemek için relaksanların kullanılmasını gerektirir. Genelde, embriyo dondurmada kullanılan vitrifikasyon sıvılarındaki kryoprotektan oranları şöyledir: %40 gliserol + %18 ficoll 70 + 0,3 M sükröz; %47,4 gliserol + %6 BSA; %40 etilen glikol + 0,3 M trehaloz + %20 PVP (19, 31).

Yumurta sarısı

Yumurta sarısında bulunan düşük dansiteye sahip fosfolipitler spermatozoon yüzeyine bağlanır ve hücresel adenilat siklazı aktive ederek kryoprotektif etki gösterirler (18). Birçok araştırmada lipozomlardan elde edilen fosfolipitlerin koruyucu etkileri araştırılmış, türe göre koruyucu etkili fosfolipit kaynakları saptanmıştır (22).

Antifreeze proteinler

Antifreeze proteinlerinin farklı moleküler ağırlığa sahip, tripeptit zincirlerden oluşan üç tipi vardır. Bu proteinler düşük sıcaklığa sahip sularda (-1,8°C) yaşayan balıklar, böcekler, bakteriler ve bitkilerden izole edilmektedir. Antifreeze proteinlerin oosit ve embriyonun vitrifikasyon sıvısına 40 mg/ml oranında katılması çözüm sonu canlılığı, koç spermasının dondurulmasında da sulandırıcıya 10 µg/ml oranında katılması, çözüm sonu motiliteyi artırmaktadır (9, 33, 34).

Diğer kryoprotektif ajanlar

Kryoprotektif ajanlardan soya fasülyesi ekstraktlarının, hücrenin soğutulması sırasında membran akışkanlığını azaltarak koruyuculuk sağladığı bildirilmektedir. Bir

surfaktan olarak Orvus ES paste (sodium dodecyl sulfate, OPS) donmaya karşı duyarlı türlerin (domuz, köpek, fare, primat, koç) sperma sulandırıcılarına %0,5-1 oranında katılmasının, çözüm sonu parametreleri etkilediği ve gebelik oranını yükselttiği bildirilmektedir. (18, 42, 44). Ayrıca pentoxifylline, caffeine, sodium nitroprusside, platet activating factor, BHT ve hyaluronic acid'in spermatozoonun çözüm sonu yaşamına katkı sağladığı bildirilmektedir (32).

Kryobiyolojik saklamanın mekanizması

Hücrelerin dondurulmasında suyun biyolojik formunun değişimi (transformasyon) söz konusudur. Yani dondurma, suyun biyolojik olarak kristalleşmesi, şekil değiştirmesi ile gerçekleşir. Hücrelerin dondurulma işlemi sırasında ekstrasellüler solüsyon/medium kendiliğinden veya etkime (seeding) ile -5 ila -10°C' de kristalleşir. Ancak intrasellüler ortam hücre membranının etkisiyle henüz donmamıştır. Söz konusu oluşum sırasında ekstrasellüler suyun buzlaşması nedeniyle ortamda bulunan maddelerin yoğunluğunda artış oluşur. Bu durum kimi kimyasal maddelerin hücre içinde ve dışında farklı yoğunlukta bulunmalarına yol açar. Meydana gelen farklı yapı ya da denge nedeniyle bir kısım sıvının hücre dışına çıkması (dehidrasyon) ile bu kez de hücre içinde bulunan bir kısım erimiş maddelerin yoğunluğunda yükselme meydana gelir ve hücre içerisinde de kristaller oluşur. Açıklanmaya çalışılan oluşumlar hücrelerin dondurulmasında olduğu gibi çözdürülmesinde de (ters yönde ve dekrizalizasyon halinde) soğutma hızının etkisine bağlı olarak az ya da çok meydana gelir (25, 26, 27)

Hücre (gamet) membran bütünlüğü ve normal yapısı hücrenin metabolik fonksiyonları için mutlak gereklidir. Normal vücut ısısında hücre membran yapısı lamelli, iki sıralı fosfolipit yapısında ve dizilmiş proteinlerden oluşur. Ortamın ısı değişimleri (özellikle düşme) direk söz konusu membran yapısını etkilemesi (soğuk şoku) ile birlikte metabolik olaylarda azalma, sapma, düşme, intrasellüler iyon ve molekül kayıplarına yol açar (25, 26).

Soğutma zararı

Gametlerdeki soğutma zararı (cryoinjury), hiperozmotik stres, soğuk şoku stresi, ozmotik büzüşme-şişme sonucu oluşmaktadır. Hiperozmotik çevrenin yaratılmasında ortam pH'sı, sellüler dehidrasyonda artış, hücre membranı protein-lipit kompleksinin zayıflaması önemli yer tutar. Donma esnasında, oosit ve embriyoda oluşan koyu lipit damlacıklarının soğuk şoku hasarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir (15, 38).

Domuz oositleri ile sığır oositleri ve klaviç embriyolarındaki hasar, 0°C'de hızla gelişmeye başlanmaktadır. Metafaz-2 oositi, kromozomları tutan ağların depolimerizasyonundan dolayı soğuk şokuna karşı

irreversibl olarak duyarlıdır (20, 38). Boğa, koç, domuz ve aygır spermatozoonu ani ısı düşmesiyle oluşan soğuk şokuna karşı köpek, kedi, ve tavşan spermatozoonuna göre daha duyarlılık göstermektedir. Gamet ve embriyonun soğuk şokuna maruz kalmasında gelişen zararlar, intrasellüler dehidrasyon, membran lipid ve proteinlerinde destabilizasyon-denatürasyon, hücre ve endoplazmik retikülümünde ozmotik şişme, plazma membranında intramembranöz kümeleşme, zona pellusidada fraktür, akrozomal enzimlerin salınımı, soğuk şokuyla spermatozoonun sirküler hareketi ve motilite kaybı, oositlerin in vitro fertilizasyonunda kayıplar olarak sıralanabilir (10, 39, 46, 47, 49). Bunların sonucunda, hücrede apoptozis, serbest radikal oluşumu, ATP sentezinde ak-sama, fertilitate kaybı, polispermi ve tetraploidi oluşmaktadır (38).

Kristal oluşumu

Kristalleşme endotermik bir proses olup, ortamda latent ısı dalgasını ortaya koymaktadır. Sıvılardaki kristalleşmeyi takiben, donmamış fraksiyondaki fiziksel özellikler değişmekte, kristalleşmenin doğurduğu gaz, ortam viskozitesini artırmakta ve pH'da önemli değişimler yapmakta ve kristalleşmenin yarattığı stres faktörü, hücrede ozmotik büzüşmeye ve polimerizasyona, membran lipid fazında değişimlere yol açmaktadır (46, 49).

Oosit ve embriyoda sıcaklığın 0°C'nin altına düşmesi intrasellüler kristalleşme riskini artırır. Embriyo dondurulmasında oluşan kristal formasyonu, çözüm esnasında oluşan kristalleşmeden daha zarar vericidir (38). Memeli oosit ve embriyoları büyük hacimli olduklarından dolayı soğutulma esnasında, lethal etkili intrasellüler kristalleşmeye yatkın olmaktadır. Bunu engellemek için vitrifikasyonla hücre stoplazması yoğun eriyiğe maruz bırakılmı, kristalizasyon oluşmadan yada şekillenmeden solidifikasyon oluşturulmalıdır (20).

Gamet ve embriyo dondurulmasında kristalleşmenin başlatılması

Kristalleşmenin başlatılması (seeding) donma sıcaklığına ulaşmamış sıvılarda ekzojen etkiyle -5°C ila -7°C arasında indüklenmekte ve kristalizasyondaki latent ısı dalgasının yaratacağı zararı minimize etmektedir. İnsanlarda -5°C, tavşanlarda ise -6°C'deki seeding, çözüm sonu motiliteyi artırmaktadır. Seeding programlanabilir dondurma cihazlarıyla yapılan dondurma işlemini daha kontrollü yapmakta, spontan şekillenen kristalleşmeyi önlemekte ve ekstrasellüler ortama sıvı geçişinde yeterli süreyi sağlamaktadır. Seeding, koç ve domuz spermasının dondurulmasında olumlu etkiye sahip değildir (40).

Ozmotik stres ve ozmotik şişme

Donma işleminde etkili en önemli faktör hücrede oluşan ozmotik strestir. Donma sırasında hiperozmotik

ortam oluşmasına rağmen, çözüm esnasında kristalizasyonun ortadan kalkmasıyla bu ortam azalmaktadır. Ozmotik stres, intra/ekstrasellüler ortamdaki ozmotik farktan ileri gelmektedir. Bu ozmotik farklılığın hesaplanması, hücreden hangi oranda suyun uzaklaştırılmasında önemlidir. Suyun uzaklaştırılma oranı ise doğrudan ortama katılacak kryoprotektan yoğunluğuyla ilişkilidir (10).

Kryoprotektanların ilavesi ortamın hiperozmotik olmasına, hücre membranından içeriye girmesiyle hücrede dehidrasyonun şekillenmesine neden olmaktadır. Kryoprotektanların uzaklaştırılmasında hücreler tekrar şişmekte ve izozmotik hacme ulaşmaktadır (48). Bu tekrarlanan değişimler kritik noktaları geçtiğinde, hiperozmotik bağıli irreversible membran yıkımı oluşur. Ayrıca hücredeki küçük porların varlığı potasyum ve sodyum iyonlarının giriş-çıkışını sağlayarak, hücrenin hipoozmotik stres ve koloidal ozmotik hemolize duyarlılığını artırır. Bu durumun önüne geçmek için ortama kademeli olarak kryoprotektanların ilavesi ve oosit/embriyoların eksternal kryoprotektan içeren sıvılarla muamele edilmelerini gerektirmektedir (15, 20, 35).

İki faktör hipotezi

Mazur ve arkadaşlarının (27) ortaya attığı iki faktör hipotezine göre; hızlı soğutma zararı, hücrede şekillenen kristalleşmeyle ilgilidir. Yavaş soğutma zararı ise hücrenin kryoprotektanlara uzun süre maruz kalmasında ya da aşırı büzüşmesinde oluşmaktadır.

Hücre membran parametreleri

Hücreler su içeriğine, hacmine, soğutulma duyarlılığına ve sitoplazmik membranın sıvı permeabilite katsayısına göre spesifik soğutma oranına sahiptir. Donma esnasında gamet ve embriyonun su alış-verişinin hesaplanması, hücrenin donmaya ve kryoprotektanlara karşı ozmotik tepkinin belirlenmesi, lethal etkili intrasellüler donma insidensinin azaltılması ve kryoprotektanların optimum katım oranlarının saptanması bazı membran parametrelerinin belirlenmesine bağlıdır. Bu parametreler, ozmotik inaktif hacim, hidrolitik iletkenlik (L_p), eriyik permeabilitesinin aktivasyon enerjisi (V_p) ve hücre yüzeyi/hacim oranıdır (23, 27).

Sonuç

Hücreler soğuk şokuna maruz kaldıklarında membransel ve ozmotik değişikliklere uğramaktadır. Bu değişiklikler hücrelerin çözüm sonu yaşam/fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Özellikle reproduksiyonda gamet ve embriyoların soğuk şoku ve ozmotik zarara karşı ortamlarına kryoprotektif ajanların katılması, çözüm sonu canlılığı ve fertilitateyi optimize etmektedir. Son yıllarda geliştirilen bazı membransel parametreler, kryoprotektanların ortama hangi oranda katılacağına

belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kryobiyolojik mekanizmaların daha da iyi anlaşılması, eşey hücrelerinin dondurulmasındaki başarıyı artırarak fertilitiyi olumlu yönde etkileyecektir.

Kaynaklar

1. **Alvarenga MA, Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM** (2000): *Acrozomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems*. Equine Vet J, **32**, 541-545.
2. **Alvarenga MA, Papa FO, Landim-alvarenga FC, Medeiros ASL** (2005): *Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review*. Anim Reprod Sci (Basında).
3. **An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Takashi M** (2000): *Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa*. Cryobiology, **40**, 237-249.
4. **Arav A, Hehu D, Mattioli M** (1993): *Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes*. J Reprod Fertil, **99**, 353-358.
5. **Ball BA, Vo A** (2001): *Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential*. J Androl, **22**, 1061-1069.
6. **Cabria E, Anel L, Herraez MP** (2001): *Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm*. Theriogenology, **52**, 623-635.
7. **Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP** (1999): *In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vitro*. Cryobiology, **39**, 185-191.
8. **Chen Y, Foote RH, Brockett CC** (1993): *Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm*. Cryobiology, **30**, 423-431.
9. **Cheng A, Merz KM** (1997): *Ice-binding mechanism of winter flounder antifreeze proteins*. Biophys J, **73**, 2851-2873.
10. **Curry MR, Watson PF** (1994): *Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury*. Cryobiology, **31**, 39-46.
11. **Dinnyes A, Urbanyi B, Baranyai B, Magyary I** (1998): *Chilling sensitivity of carp (cyprinus carpio) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress*. Theriogenology, **50**, 1-13.
12. **Dobrinsky JR** (2002): *Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos*. Theriogenology, **57**, 285-302.
13. **Donoghue AM, Wishart GJ** (2000): *Storage of poultry semen*. Anim Reprod Sci, **62**, 213-232.
14. **Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M** (2003): *Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation*. Biol Reprod, **68**, 87-94.
15. **Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Crister, JK** (1993): *Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis*. Biol Reprod, **49**, 112-23.
16. **Gomes GM, Jacop JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA** (2002): *Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the mangalarga marchador breed*. Theriogenology, **58**, 277-279.
17. **Holt WT** (2000): *Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences*. Theriogenology, **53**, 47-58.
18. **Holt, WT** (2000): *Basic aspects of frozen storage of semen*. Anim Reprod Sci, **62**, 3-22.
19. **Kasai M** (1996): *Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos*. Anim Reprod Sci, **42**, 67-75.
20. **Kasai M** (2002): *Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification*. Reprod Med Biol, **1**, 1-9.
21. **Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P** (1998): *Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations*. Cryobiology, **37**, 325-338.
22. **Leeuw FED, Leeuw AMD, Daas JHG, Colenbrander BV, Erkleij AJ** (1993): *Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing*. Cryobiology, **30**, 32-44.
23. **Leibo SP, Brandley L** (1999): *Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa*. 502-515. In: C Gagnon (Ed), The Male Gamet. Cache River Press, St Louis.
24. **Massip A** (2001): *Cryopreservation of embryos of farm animal*. Reprod Dom Anim, **36**, 49-55.
25. **Mazur P** (1977): *The role of intercellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates*. Cryobiology, **14**, 251-272.
26. **Mazur P** (1984): *Freezing of living cell: mechanisms and implications*. Am J Physiol, **247**, 125-142.
27. **Mazur P** (1990): *Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos*. Cell Biophysics, **14**, 53-92.
28. **Megann LE** (1978): *Differing action of penetrating and nonpenetrating agents*. Cryobiology, **15**, 382-390.
29. **McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP** (1995): *Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides*. Hum Reprod, **10**, 1163-1171.
30. **Morrell JM, Hodge JK** (1998): *Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research*. Anim Reprod Sci, **53**, 43-63.
31. **Mtango NR, Varisanga, MD, Dong YJ, Otoi T, Suzuki T** (2001): *The effect of freezing the diluent portion of the straw in a step-vitrification process using ethylene glycol and polyvinylpyrrolidone to preserve bovine blastocysts*. Cryobiology, **42**, 135-138.
32. **Oehninger S, Duru NK, Srisombut C, Morshedi M** (2000): *Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome*. Mol Cell Endocrinol, **169**, 3-10.
33. **Palasz AT, Mapletopt, RJ** (1996): *Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances*. Biotechnol Adv, **14**, 127-149.
34. **Payne SR, Oliver JE, Upreti GC** (1994): *Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa*. Cryobiology, **31**, 180-184.

35. **Pedro PB, Zhu SE, Makino N, Sakurai T, Edashige, Kasai, M** (1997): *Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages*. Cryobiology, **35**, 150-158.
36. **Polge C, Smith A, Parkes A** (1949): *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures*. Nature, **164**, 166.
37. **Rudolph AS, Crowe JH** (1985): *Membrane stabilization during: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline*. Cryobiology, **22**, 367-377.
38. **Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO** (2000): *Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue*. Theriogenology, **53**, 59-72.
39. **Singh MP, Singh AK, Singh BK, Prasad RL** (1996): *Effect of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing*. Theriogenology, **45**, 405-416.
40. **Songsasen N, Leibo SP** (1997): *Cryopreservation of mouse spermatozoa. 1. effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa*. Cryobiology, **35**, 240-254.
41. **Storey BT, Noiles EE, Kathleen AT** (1998): *Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation*. Cryobiology, **37**, 46-58.
42. **Tekin N, Günzel AR** (1986): *Investigations of the freezing of ram semen using different diluents and in vitro evaluation procedures*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **33**, 381-393.
43. **Tekin N, Secer S, Akçay E, Bozkurt Y** (2003): *Cryopreservation of rainbow trout (oncorhynchus mykiss) semen*. Israeli J Aquacult, **55**, 208-212.
44. **Tsutsui T, Hase, M, Hori T, Ito, T, Kawakami, E** (2000): *Effects of orvus es paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing*. Vet Med Sci, **62**, 533-535.
45. **Vicente JS, Viudes-De-Castro, MP** (1996): *A sucrose-dmsa extender for freezing rabbit semen*. Reprod Nutr Dev, **36**, 485-492.
46. **Watson PF** (1995): *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function*. Reprod Fertil Dev, **7**, 871-891.
47. **Watson PF** (2000): *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. Anim Reprod Sci, **60**, 481-492.
48. **Woelders H** (1997): *Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen*. Vet Quart, **19**, 135-138.
49. **Woods EJ, Gilmore JA, Liu J** (2000): *Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods*. Hum Reprod, **15**, 335-343.

Geliş tarihi: 24.11.2005 / Kabul tarihi: 10.03.2006

Yazışma adresi

Mustafa Numan Bucak
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Sun'ı tohumlama Anabilim Dalı
Dışkapı 06110, Ankara
e-mail: mustafabucak@hotmail.com