

# Kanser Hastalarında Fertilitenin Korunmasında Kullanılan Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Gülnaz KERVANCIOĞLU<sup>1</sup>

## z

Günümüzde erken tanı ve tedavilerdeki gelişmelerle kanser hastalarında sağ kalım süreleri uzamıştır. Kanserli hastanın onkoloji tedavisinden sonra da üreme yeteneğinin korunması yaşam kalitesinin yükseltilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Erişkin kadın ve erkeklerde olgun üreme hücrelerine ulaşmak mümkündür. Embriyo ve oosit dondurulmasında vitrifikasyon yöntemi, spermatozoa ve testis hücre süspansiyonu dondurulmasında yavaş dondurma yöntemi, over dokusu dondurulmasında ise her iki yöntem tercih edilmektedir. Prepubertal dönemde ise gonad dokularının yani üreme kök hücrelerinin kriyoprezervasyonu tek seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak prepubertal testis dokusunun kriyoprezervasyonu henüz deneysel aşamdadır. Kanser hastaları için fertilitte restorasyon tekniklerindeki gelişmeler, yakın bir gelecekte kliniklerde rutin olarak uygulanabilmesi açısından umut vadetmektedir. Ancak prepubertal erkek çocuklarda testis dokusundaki spermatogonyal kök hücrelerin güvenli ve en uygun şekilde kriyoprezervasyonunu sağlayacak detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Kriyoprezervasyon, Fertilitte prezervasyonu, Prepubertal testis, Kanserde kriyoprezervasyon

## Cryopreservation Methods Used for the Preservation of Fertility in Cancer Patients

### Abstract

Nowadays, early diagnosis and treatment modalities prolong the survival rates of cancer patients. The preservation of the reproductive ability after the oncology treatment of a cancer patient has an important factor in raising the life quality of the person later on. It is possible to acquire mature reproduction cells in adult men and women. Vitrification method is preferred for embryo and oocyte freezing, slow freezing method is used for freezing of spermatozoa and testis cell suspension, and both methods are suitable for over tissue freezing. Cryopreservation of gonadal tissues -as known as reproductive stem cells- is the only alternative in the pre-pubertal period. However, cryopreservation of pre-pubertal testicular tissue is still experimental. The developments in fertility restoration techniques for cancer patients are promising in that they can be routinely implemented in clinics in the near future. However, in pre-pubertal boys, detailed research is needed for ensuring the safe and optimal cryopreserving of spermatogonial stem cells in the testicular tissue.

**Keywords:** Cryopreservation, Fertility prereservation, Prepubertal testis, Cryopreservation in cancer

<sup>1</sup> Dr. Glnaz KERVANCIOĞLU, İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD.  
Yazışma Adresi: İstanbul Aydın Üniversitesi, Beşyol Mahallesi İnn Cad. No:38, 34295 Küçükçekmece/İstanbul  
Tel: 444 1 428, e-posta: gulnazkervancioglu@aydin.edu.tr  
Geliş Tarihi: 2 Nisan 2018; Kabul Tarihi: 7 Mayıs 2018

## **Giriş**

Kanserler, erişkinde ve çocukta en sık ölüm nedenlerinden birisidir. Son yıllarda kanserlerin erken tanı ve tedavilerindeki gelişmeler sağ kalım oranlarını yükseltmiştir. ASC (American Cancer Society) tüm kanserlerden ölüm oranlarında, kadınlarda 1991-2005 yılları arasında %11.4, erkeklerde ise 1990-2005 yılları arasında %19.2 oranında azalma, sadece kadınlarda meme kanserinden ölümlerde %40 oranında azalma olduğunu bildirmektedir (1). Erişkinde 5 yıllık sağ kalım oranları %60'lara, çocukta %80'lere kadar çıkmıştır. Bu hastalarda yaşam sürelerinin uzamasının yanında ikincil sorun olarak yaşam kalitelerinin yükseltilmesi gereği karşımıza çıkmaktadır.

Gonadotoksik tedavilerin en önemli yan etkisi özellikle prepubertal dönemdeki çocuklarda germinal kök hücrelerin etkilenmesidir. Etkilenmenin seviyesi tedavi dönemindeki hastanın yaşına, kullanılan ilaçların tipine, uygulanması durumunda radyoterapinin dozuna ve uygulandığı bölgeye bağlı olarak değişmektedir (2). Onkoloji tedavileriyle üreme hücreleri olumsuz etkilenen hastaların, tedaviden sonra kendi çocuklarına sahip olabilmesi, önemli beklentilerden birisidir. Fertilitate yeteneklerinin ve üreme hücrelerinin güvence altına alınabileceği bilgisinin hastaya sunulması kansere karşı verdikleri duygusal savaşta onlara yardımcı olmaktadır. Üreme hücre ve dokularının onkoloji tedavileri öncesinde hastadan alınması ve alınan hücrelerin dondurulup saklanması, klinisyen ve embriyoloji uzmanlarının işbirliği içinde çalışmasıyla gerçekleşmektedir.

Son yıllarda üreme hücre ve dokularının laboratuvar koşullarında uzun süre bozulmadan uygun şekilde dondurularak saklanması için çeşitli araştırmalar yapılmıştır (3). Erişkin ve özellikle prepubertal erkek çocukların üreme doku ve hücrelerinin dondurulup saklanması (kriyoprezervasyon), farklı tekniklerin uygulanması ve geliştirilmesini gerektirmektedir. Günümüzde erişkin gonad doku ve üreme hücreleri için embriyoloji laboratuvarlarında uygun kriyoprezervasyon yöntemleri nispeten oturtulmaya başlanmıştır. Ancak prepubertal dönemdeki erkek çocuklarda testiste zaten az sayıda olan spermatogonyal kök hücrelerin kriyoprezervasyonu için en uygun

yöntemin geliştirilip standardize edilmesi, aşılması gereken bir sorun olarak karşımızda durmaktadır (4,5).

## **Fertilitenin Korunmasında Kriyoprezervasyonun Uygulanma Tarihiçesi**

Kriyoprezervasyon, artık yaygın olarak dünyada donör inseminasyonlarda, ülkemizde ise özellikle gonadotoksik tedaviler öncesinde spermatozoanın dondurulmasında başvurulan yöntem olarak rutin uygulamaya girmiştir (6). Bu yönüyle kriyoprezervasyonun fertilitede kullanımı epey mesafe katetmiş durumdadır.

1949 yılında Polge ve araştırma grubunun, gliserolün kriyoprotektif etkisini tesbit etmesiyle, ilk kez memelilerde spermatozoa başarıyla dondurulmuştur (7).

1950'li yıllarda dondurulmuş spermle ilk gebelik gerçekleşmiş (8), Bu uygulama çeşitli organ, doku ve hücrelerin dondurulmasına öncülük etmiş, çeşitli kimyasallar ve malzemeler dondurma işleminde kullanılmaya başlamıştır.

1970'li yıllarda yavaş dondurma yöntemi için programlanabilir dondurucu makinalar geliştirilmişçeşitli insan ve hayvan hücrelerinin dondurulmasında kullanılmıştır.

Erkek infertilitesinde sperm kriyoprezervasyonu, 1980'li yıllardan itibaren üremeye yardımcı tekniklerde rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır (9).

Embriyo dondurulması memelilerde ilk kez 1972 yılında uygulanmış (10), insanda ise embriyo dondurulması 1980'lerin başında başlamıştır. Devam eden çalışmalarla ilk kez 1984 yılında yavaş dondurma yöntemiyle, 1985 yılında da vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan embriyolar kullanılarak doğumlar gerçekleştirilmiştir (11,12).

1996'da dondurulup çözülmüş erişkin ve prepubertal testis hücre süspansiyonu, sterilizasyon uygulanan fare testisine transplante edilerek spermatogenezin gerçekleştirilmesi (13) hücrelerin uzun süre saklanabileceği ve dolayısıyla kriyoprezervasyonun bu tedavilerde kullanılabileceğini gösterilmiştir. Prepubertal testis, doku olarak ise 2000'li yıllarda

yavaş dondurma yöntemiyle, son yıllarda da vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmaya başlamıştır (14).

### Kanserli Kadında reme Hücre ve Dokularının Korunması İçin Sunulabilecek Kriyoprezervasyon Seçenekleri

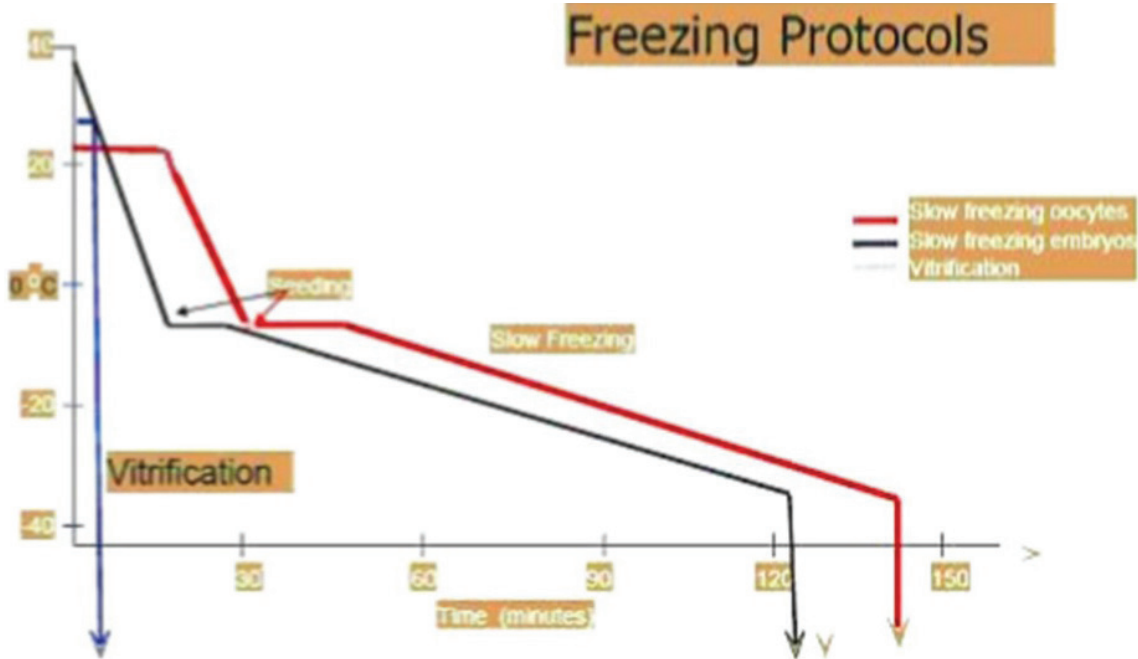
**-Embriyo dondurma;** OPU ile toplanan oositler, spermatozoon ile invitro ortamda IVF veya ICSI yöntemi ile fertilize edilerek elde edilen embriyolara kriyoprezervasyon uygulanır. Embriyo dondurma fertilizasyonun korunması için seçilecek en başarılı yöntemdir. Evli hastalarda uygulanabilir. Ancak süratle kanser tedavisine başlanacak hastalarda embriyo elde etmek için zamana ihtiyaç olacağından bu grup hastalar için uygun değildir.

**-Oosit Dondurma;** Birden fazla sayıda oluşturulan matür oositlerin toplanarak dondurulması işlemidir. Amerikan reme Derneği (ASRM) tarafından hastalara rutin olarak sunulması gereken yöntem olarak kabul edilmiştir (15). Evli olmayan ya da embriyo dondurmaya etik ve dini yönlerden uygun bulmayan hastalarda ilk seçenektir. Oosit dondurulmasında yavaş dondurma yöntemi uygulanmış ve son yıllarda yapılan çalışmalar vitrifikasyon yönteminin başarisının daha yüksek

olduğunu göstermiştir. Vitrifikasyon yöntemi, embriyo ve oosit dondurulmasında başarılı bir kriyoprezervasyon yöntemi olarak tercih edilmektedir (3,16) (şekil 1).

**-Over Dokusu Dondurma;** Primordiyal foliküllerin yoğun olarak bulunduğu over korteksi soyularak alınır ve doku parçaları olarak dondurulur. Oosit sayısı, kız çocukta intra uterin fetal 5. ayda 7.000.000, pubertede 300.000, 40-45 yaşda 8.000 adet olarak giderek azalması (17) nedeniyle rezervi iyi olan geç erişkin kadında ilk seçenek, pubertal ve prepubertal dönemdeki kız çocuklarında tek seçenek olarak uygulanmaktadır. Ek olarak embriyo ve oosit dondurma için zamanı olmayan veya tıbbi olarak buna engel bir durumu olan kanser hastalarında da tercih edilmektedir.

Over dokusunun dondurulmasında kriyoprezervasyon yöntemi olarak hem yavaş dondurma hem vitrifikasyon yöntemlerinin etkileri birbiriyle karşılaştırılmış (3,16) veya sadece vitrifikasyon yöntemi uygulanmış (18,19,20) sonuç olarak her iki kriyoprezervasyon yönteminin de primordiyal folikülleri ve stromal yapıyı iyi koruması nedeniyle tercih edilecek yöntemler olduğu bildirilmiştir (21).



şekil 1. Yavaş dondurma (slow freezing) ve vitrifikasyon yöntemlerinin oosit ve embriyoya uygulanışı.

### Kanserli Erkekte Üreme Hücre ve Dokularının Korunması İçin Sunulabilecek Kriyoprezervasyon Seçenekleri

**-Sperm dondurma** (semen, testiküler veya epididimal spermatozoa); ejakülattan elde edilen ya da PESA (Perkutan Epididimal Sperm Aspirasyonu), TESA (Testiküler Sperm Aspirasyonu), MESA (Mikroskop altında Epididimal Sperm Aspirasyonu) ile elde edilen spermatozoa dondurulmaktadır. Birçok üremeye yardımcı tedavi merkezlerinde kanser tedavisi başlamadan önce sperm kriyoprezervasyonu genel bir öneri olarak tavsiye edilip rutinde uygulanmaktadır. Genellikle spermlerin in vitro ortamda yıkanıp kriyoprotektan eklenerek klasik yavaş dondurma yöntemi ile dondurulması tercih edilmektedir (6).

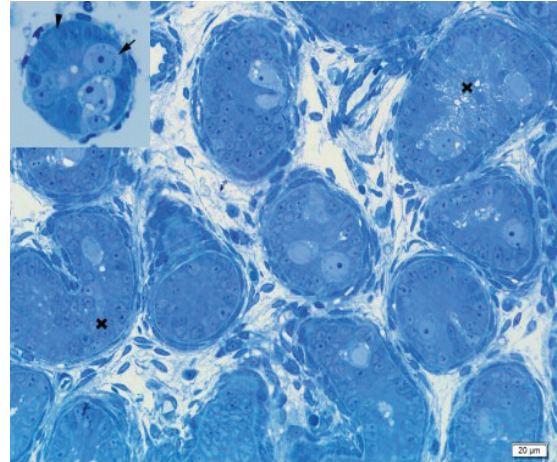
**-Testis dokusu dondurulması:** Testis dokusu, TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu), mikro TESE (Mikroskop altında Testiküler Sperm Ekstraksiyonu) şeklinde biyopsi ile alınıp ya doğrudan doku parçaları şeklinde (4,5) ya da testis hücre süspansiyonu haline getirilerek kriyoprezervasyon sağlanabilir. Testisin doku parçaları olarak dondurulmasında vitrifikasyon yöntemi, testis hücre süspansiyonu şeklinde dondurulmasında yavaş dondurma yöntemi tercih edilmektedir (22,23).

### Kanserli Prepubertal Erkek Çocuklarda Testis Dokularının Korunması ve Kriyoprezervasyonu

Prepubertal testis dokusunun kriyoprezervasyonu erişkin testis dokusunun kriyoprezervasyonu ile farklılık göstermektedir. Çünkü prepubertal dokuda spermatogenez henüz başlamamış olması nedeniyle spermatogenetik seri hücreleri bulunmaz. Sadece az sayıda spermatogonyal kök hücreler (SKH) bulunur. Prepubertal testis dokusunun histolojik yapısının anlaşılması için, testisin fetal ve histolojik gelişim sürecinden bahsetmek gerekmektedir.

Fetal dönemde ve doğumda seminifer tübüller solid haldedir. Henüz tübülüs lümeni oluşmamıştır. Tübülüs lümeni puberteden itibaren gelişir. Seminifer tübülüslerde Sertoli hücreleri ve germ hücreleri bulunur. Fetal testiste, seminifer hücrelerin büyük çoğunluğunu Sertoli hücreleri oluşturur (24). Embriyonal dönemde gonad taslaklarına göç eden primordiyal germ hücreleri, testiküler kordonları oluşturan Sertoli hücre

öncüllerinin ve peritübüler myoid hücrelerin etkisiyle gonositlere dönüşür. Gonositler testiküler kordonların merkezinde bazal membrandan uzağa yerleşir. Fetal dönemde sıçan ve farede kısa bir süre proliferasyon gösterir, sonra hücre siklusunun Go fazına girer ve doğuma kadar bu şekilde kalır (25,26,27). Prepubertal testis dokusunda gonositler, seminifer tübülüslerin merkez bölgesinde (hücre siklusunun Go fazında) görülür. Gonositler daha sonra bazal membrana doğru göç etmeye ve proliferasyona başlar (28,29,30). Gonositler, yuvarlak şekilli iri hücrelerdir. Gonositler bazal membrana doğru göç ederken (Farede gonositler bazal membrana doğumdan sonra 4-5. günde göç eder) sitoplazma, ilerleyeceği yöne doğru uzayıp psödopod oluşturarak (Sertoli hücreleri arasından geçerek) hareket eder. Gonositler çeşitli aşamalardan geçerek erişkin SKH'lerini oluşturur. SKH'ler, diğer dokulara özel kök hücreler gibi kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahiptir (31,32,33) (Şekil 2).



**Şekil 2.** Prepubertal testis dokusu yarı ince kesit. Seminifer tubuluslar (X), Gonosit (ok), Sertoli hücreleri (ok başı) sol üst resim.

Fetal ve yeni doğan döneminde gonosit olarak isimlendirilen immatür spermatogenik hücreler, bazal membrana göç ettiklerinde spermatogonyum (SG) olarak isimlendirilmektedir (34). SG'lerin mitoz bölünmelerle oluşturduğu, testis dokusuna özel kök hücre topluluğu (Ad dark SG, Ap pale SG, B SG) da SKH'lerini oluşturmaktadır. Bu hücreler puberteden itibaren başlayan spermatogenezle olgun spermatozoayı oluşturup üretkenliği sağlar (35).

Gonositler gç esnasında A single (As) veya isolated (Ais) da denilen SG'ye dönüşür. Sıçanda gonositler bir hafta içinde yaklaşık 9 mitoz bölünme geçirir. Ancak henüz As SG'nin, proliferasyon gösteren SG'ye farklılaşmasının ya da kök hücre olarak kalıp kendisini yenilemesinin hangi mekanizma ile gerçekleştiği bilinmemektedir. As SG mitoz geçirerek birbirlerine hücreler arası köprü ile bağlı iki yavru A paired (Apr) SG'ye dönüşür. Bu hücreler de tekrar iki veya üç kere bölünerek A aligned (Aal) SG'lere dönüşür ve bir hücre zinciri oluşturur. As, Apr, Aal SG'ler A undiferansiye (Aund) SG'yi oluşturur. Aund SG'ler proliferatif SG'lerdir. Doğumdan sonra 8. günde faredede Aund hücrelerinin sayısı erişkindeki hücre sayısına ulaşır. Aal SG mitoz geçirmeden A1 tip SG'ye dönüşür. A1 tip SG altı kere mitoz bölünme geçirerek, A2, A3, A4 ve intermediate tip (In) SG'ler ve daha sonra B tip SG'leri oluşturur, bu hücreler diferansiye SG'lerdir. 10-12 günlük faredede SKH kolonisi en yüksek seviyeye ulaşır. B tip SG bölünerek spermatositleri oluşturur ve mayotik süreç başlar (30), B tip SG, spermatogonyal fazın son hücresidir (Tablo 1).

Prepubertal testiste, Sertoli hücreleri seminifer tübülüslerde SKH'lerin bazala yerleşmesini sağlar. Sertoli-Sertoli arasında bazolateral yüzeyde, SKH'lerin tamamen bazal membrana göç ederek yerleşmesinden sonra sıkı bağlantılar gelişir. Bu sıkı bağlantılar bazal ve adluminal kompartman arasında kan-testis bariyerini oluşturur. Spermatogenez başladığında preleptoten spermatositlerin, bazal kompartmandan adluminal kompartmana geçişi esnasında sıkı bağlantılar (36) geişiye izin vererek üçüncü bir kompartman olan geçici ara (intermediate) kompartmanın oluşmasını sağlar. Intermediate kompartman hücre geçişi esnasında oluşur. Sıkı bağlantıların geişiye izin verme

mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Kan-testis bariyeri, kan ve lenfatik sıvıda bulunan toksik maddelerin tübülüs lümenine geçişini engeller. Aynı zamanda immunolojik bir bariyer fonksiyonuyla da otoantikörlerin geçişini engeller. Sertoli hücrelerinin, sıkı bağlantı noktalarının üst kısmında kalan yüzeylerinden salgılanan sıvı adluminal kompartmanda toplanır. Doğumda mevcut olmayan tübülüs lümenini o dönemde Sertoli hücrelerinin sitoplazması doldurur. Sertoli hücrelerinden salgılanan sıvının geriye doğru akarak bazala geçişini kan-testis bariyeri engeller. Adluminal kompartmanda kalan sıvının basıncı seminifer tübülüs lümeninin oluşmasını sağlar. Seminifer tübülüs lümeninin gelişmesi, sıkı bağlantıların oluşması ile doğruda ilişkilidir. Salgılanan bu sıvı spermatozoanın genital kanallardan geçişini kolaylaştırır (37).

Fetal ve histolojik gelişim süreci dolayısıyla, prepubertal dönemdeki kanser tedavisi uygulanacak erkek çocuklarda testis dokusunun dondurulması tek seçenek olarak uygulanmaktadır (38). Uygulanacak kriyoprezervasyon yöntemi, SKH'ların yüksek oranda yaşamalarını sağlayacak ve fonksiyonlarını koruyacak dondurma yöntemi olmalıdır (39).

Prepubertal testis dokusu, erişkindeki gibi ya doku parçaları ya da testis hücre süspansiyonu (40) şeklinde dondurulabilmektedir. Testis doku olarak dondurulduğunda, doku bütünlüğü korunduğu için hipoksiye tek hücreye oranla daha dayanıklıdır (41). Ancak doku, hücre bağlantılarının korunması nedeniyle hücre süspansiyonuna kıyasla daha fazla geçirgen kriyoprotektan gerektirir (42). Fazla kriyoprotektan kullanımı hücrelerde harabiyetin artmasına neden olur. Bu nedenle testisin hücre süspansiyonu şeklinde dondurulmasının hücre canlılığını daha iyi koruduğu bildirilmektedir (43).

<b>Spermatogonyum (SG)</b>	<b>Yenilenen (undiferansiye) SG</b>	<b>Farklılaşan SG (diferansiye)</b>
As SG ( Ais SG)	Apr SG	A1, A2, A3, A4
	Aal SG	Intermediate SG
		B SG

**Tablo 1.** Spermatogonyal kök hücre tiplerinin sınıflandırılması

Testis hücre süspansiyonu, şekli, büyüklüğü ve su içeriği farklı hücre tiplerini içerdiğinden hücrelerin canlılığını ve fonksiyonunun korunmasını sağlayacak dondurma şartları uygulanmalıdır. Hücrelerin daha sonra transplante edileceği de düşünülürse kriyoprezervasyon tekniği çok önem kazanmaktadır (13).

Prepubertal testis dondurulması henüz araştırma aşamasında olup kriyoprezervasyon yöntemleri geliştirilmeye (23,39) ve insanda uygulanabilir duruma getirilmeye çalışılmaktadır.

### **Kriyoprezervasyon Nedir?**

Kriyoprezervasyon, dokuların dondurma medyumları (kriyoprotektan) ile dengelendikten sonra soğutulup -196 °C'deki sıvı azot tankı içinde dondurularak saklanmasıdır (36).

Başarılı bir dondurma yöntemi gerçekleştirmek için, dondurulan materyalin türü, kullanılan kimyasal maddeler, kullanılan malzemeler, seçilen dondurma yöntemi ve çözme işlemi önemlidir. Çözme işleminde dokunun fizyolojik ortama döndürülmesi dikkat ve titizlikle yapılmalıdır. Kriyoprezervasyon, kriyobiyojoloji, fiziksel esaslar, doku veya hücrenin yapısal özellikleri ve niteliklerinden etkilenmektedir. Dondurma esnasında hasara neden olan faktörler, solüsyon etkisi, hücre dışı buz oluşumu, su kaybı, hücre içi buz oluşumu olarak sıralanabilir. Yüksek konsantrasyonlu bazı solüsyonlar buz kristali oluşumunu artırabilir (44,45). Kriyoprezervasyon protokolleri, bir dokuda farklı hücrelerin bulunması nedeniyle her hücre tipi için, hücrenin ihtiva ettiği su miktarı, hücrelerin büyüklüğü, şekli ve sitoplazma membranı geçirgenliği arasındaki dengeyi sağlamalıdır (46).

### **Kriyoprotektanlar ve Etki Mekanizmaları**

Kriyoprotektanlar, dondurma işlemi sırasında koruyucu özelliğe ve yüksek oranda hidrojen bağlama kapasitesine sahip solüsyonlardır. Kriyoprotektanlar hücre içine geçip geçmemelerine göre, intrasellüler (geçirgen) ve ekstrasellüler (geçirgen olmayan) olmak üzere iki gruptur (6). Geçirgen kriyoprotektanlar daha çok tercih edilir. Dondurma medyumlarının geçişi hücre zarından olduğu için, harabiyetin en hızlı ve etkili meydana geldiği yer de hücre zarıdır. Hücre zarından geçen dondurucu maddelerin kullanımı, dondurma işlemi sırasında hücre içerisinde oluşabilecek

buz kristallerinin oluşumunu -40°C'ye kadar düşürebilmektedir. Bu ajanlar hücreyi dondurma işleminin zararlı etkilerine karşı olabildiğince korurlar. Dimetil sülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol, propilen glikol, propanediol (PROH) geçirgen kriyoprotektanlardır (47). DMSO, yavaş dondurma ve çözme işleminde hücre harabiyete karşı koruyucu etkisi vardır. Gliserol, büyük oranda insan spermatozoasını dondurmak için kullanılır. Etilen glikol, penetrasyon hızını artırır.

Geçirgen olmayan maddeler geçirgen kriyoprotektanla birlikte kullanıldıklarında özellikle ozmotik basınç değişikliklerinden kaynaklanan harabiyete karşı korucuyucudur. Çözme işleminde hücrenin şişmesini engelleyen bu kriyoprotektanlar, sükröz, glukoz, heksoz monosakkarit ve polisakkaritlerdir. Prepubertal testis dokusu dondurulmasında, araştırmacılar DMSO etilen glikol ve sükröz, DMSO ve sükröz kullanmayı tercih etmektedir (48,49).

Dondurma uygulaması esnasında üreme doku ve hücreleri için taşıyıcı olarak kriyotüpler ve yüksek güvenlikli strawlar tercih edilmektedir.

### **Fertilitenin Korunmasında Uygulanan Kriyoprezervasyon Yöntemleri**

Üreme doku ve hücrelerinin kriyoprezervasyonunda en sık kullanılan dondurma yöntemleri klasik yavaş dondurma (programlı ya da programsız) ve vitrifikasyon yöntemidir.

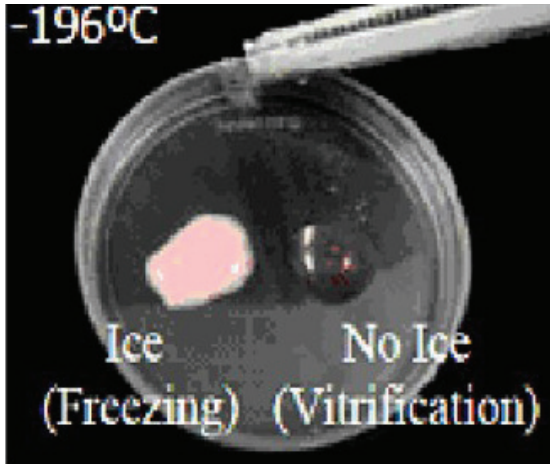
**Yavaş dondurma yöntemi;** uygulama kolaylığı açısından araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir (50). Yavaş dondurma yöntemi, geleneksel elle yapılan yöntem ve programlanabilen kriyo cihazı ile yapılan yöntemler olmak üzere iki şekilde uygulanabilir.

Elle yapılan geleneksel dondurma yönteminde, tüp veya straw içindeki dondurulacak dokuya dondurma medyumuna ilave edilerek belli bir süre (yaklaşık 30 dk) sıvı azota 810cm uzakta olacak şekilde yerleştirilir. Bu süre içinde dokunun ısı giderek düşer. Bu sürenin sonunda tüp doğrudan sıvı azot tankına konur.

Programlı yavaş dondurma yönteminde, ayarlanabilir dondurma cihazında belirlenen hızda sıcaklık azaltılır. -7°C'ye gelindiğinde bir

süre ( 5-10 dk) beklenir, bundan sonra seeding uygulanabilir. -7°C den -30 °C ve -40 °C'ye kadar belirli bir hızla (genellikle 0,2 ve 0,3°C/dk) soğutular, bunu takiben genellikle 10°C/dk hızla soğutularak sıcaklık -80°C'ye kadar inilir buradan doku -196 °C'deki sıvı azot tankına konur (6).

Ancak yavaş dondurma yönteminde hücre hasarı oluşması bir dezavantajdır. Bu yöntemde hücrede oluşan hasarın en önemli sebebi hücre içinde erken buz kristalleri oluşması ve uygun şekilde çözlememesidir. Dokular hücre dışı buz oluşumunu tolere edebilir fakat hücre içi buz oluşumu genellikle hücrenin ölümü ile sonuçlanır. Genel olarak kriyoprezervasyonda hasara neden olan faktörler, solüsyon etkisi, hücre dışı buz oluşumu, su kaybı, hücre içi buz oluşumu olarak sıralanabilir. Yüksek konsantrasyonlu bazı solüsyonlar buz kristali oluşumunu artırabilir (44,45) (Şekil 3).



Şekil 3. Vitrifikasyonda camsı görünümlü donma ve geleneksel buzlu donma görünümü.

Yavaş dondurma esnasında örnekteki buz nükleusu oluşumunu azaltmak için seeding uygulaması ve kimyasal nükleantlar, elektrofreesing, mekanik metodlar, şok soğutma, basınç kaydırması gibi çeşitli yöntemler uygulanmaktadır (51). Seeding, IVF uygulamalarında, embriyo ve oositlerin (52) yavaş dondurma yöntemiyle dondurulmasında küçük buz kristallerinin oluşumunu azaltmak için kullanılmıştır.

**Vitrifikasyon yöntemi;** doku veya hücrenin yüksek derecede (-196 °C) hızla dondurularak cam

gibi katılaşması ve hücre içi kristal oluşumunun engellenmesi esasına dayanan bir dondurma yöntemidir (Şekil 3). Bu yöntemde kristal oluşumuna fırsat vermeden, solid yapı şeklinde dondurma yapılarak buz oluşumu engellenir (45). Vitrifikasyonda kullanılan solüsyonun yüksek viskozite ve donma ısısının düşmesi gibi iki özelliğinin olması gerekir. Birçok solüsyon bu özellikte olabilir ancak büyük molekülü solüsyonlar daha etkilidir. Vitrifikasyonda kriyoprotektan antifriz gibi etki ederek donma ısısını düşürür (53). Amaç soğutma esnasında giderek yükselen viskozite artışı ile buz çekirdeğii oluşması ve büyümesinin önlenmesidir. Sistem 'cam gibi' translasyonel molekül hareketinin durdurulduğu dönemde sabitlenir. Vitrifikasyon, donmanın biyolojik hasar etkilerini bertaraf eder. İşlem esnasında 'cam gibi' yapıda bir bozulma olmaması nedeniyle vitrifikasyon tüm biyolojik sistemlerde uygulanabilmektedir (50). Bu yöntemde, uygulama esnasında kullanılacak taşıyıcı, dengeleme ve vitrifikasyon süreleri sonucun başarılı olmasında önem arz eden faktörlerdir. Dengeleme esnasında hücre önce suyunu dışarı verir büzülür, daha sonra dengeleme solüsyonu içindeki kriyoprotektan hücre içine girer ve tekrar hücre şişer. Tam bu esnada doku, vitrifikasyon solüsyonu içine konulup sıvı azot tankında dondurulur. Hücre içindeki su çekildiğii için buz kristali oluşmaz. Hücre hızla donarak katılaşır. Çözme esnasında ise süreç tersine dönerek tekrarlanır. Çözme alınan hücre osmolaritesi yüksek sükroz içine konularak hücre içindeki kriyoprotektan hücre dışına tamamen çekilir. Sükroz oranı azaltılarak hazırlanan medyumlarla terarlanan yıkamalar yapılarak hücre içine suyun tekrar alınması sağlanır (50).

Vitrifikasyon solüsyonunun çözülme esnasında kristalize olmasıyla devitrifikasyon sorunu ortaya çıkabilir. Devitrifikasyon, vitrifikasyon uygulanan dokunun ısıtılması esnasında oluşabilir. Devitrifikasyonu önlemek ve vitrikiye materyalde buz kristallerinin oluşmasını engellemek ve kaliteli bir sonuç elde etmek için, çözmenin mümkün olan en hızlı sürede ve uniform şekilde yapılması gereklidir.

Yöntemin, organ ve büyük dokuların bankalarda saklanması için kullanılabilmesi için devitrifikasyon sorununu önleyen etkili hızlı çözme tekniklerinin geliştirilmesi gerekmektedir

(54). Klasik kriyoprezervasyona alternatif bir yaklaşımla, vitrifikasyon birçok hücre sistemlerinin korunmasında önemli yöntem olarak gösterilmektedir (50).

Prepubertal testis dokusunda çözülme sonrası seminifer tübülüs yapısının ve hücrelerin canlılıklarının korunması, dondurma hızı ve kullanılan kriyoprotektandan çok etkilenir, o nedenle dondurma çözme protokolleri prepubertal testis için en uygun şekilde uygulanmalıdır. Prepubertal testis dokusu ile ilgili araştırmalar sürdürülmektedir

### **Sonuç**

Embriyo, kadın üreme hücreleri, dokuları ve spermin fertilité korunmasında saklanma yöntemlerinin daha oturmuş olması yanında testisin saklanması özellikle prepubertal erkek çocuklarda testis dokusundaki spermatogonyal kök hücrelerin en uygun şekilde dondurularak saklanması, laboratuvar teknikleri açısından çözümlenmesi gereken bir sorundur. Testisin, doku ya da hücre süspansiyonu şeklinde mi saklanması daha uygun olacağı da henüz cevap bekleyen sorulardandır. Testis fertilité restorasyon tekniklerindeki umut verici gelişmeler, yakın bir gelecekte hastalara kliniklerde uygulanabilecek duruma geleceğini düşündürmektedir.

### **KAYNAKLAR**

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2009; 59(4): 225-249.
2. Wallace WHB, Thomson AB. Preservation of fertility in children treated for cancer. Arch Dis Child 2003; 88: 493-496.
3. Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. Reproduction 2009; 138: 319-327.
4. Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, et al. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. Hum Reprod 2005; 20: 1676-1687.

5. Keros V, Hulten K, Borgstro B et al. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. Hum Reprod 2007; 22: 1384-395.
6. Delilbaşı L. In Vitro Fertilizasyon (IVF). Laboratuvar yöntemleri (Yeni uygulamalar ve güncel yaklaşımlar). Ankara: Güneş Kitabevleri; 2008. 61-83.
7. Curry MR. Cryopreservation of Semen from Domestic Livestock. Ed: Day JG, McLellan MR, Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Totowa:Humana Press; 1995. 189-197.
8. Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen. Fertil Steril 1954; 5: 520-529.
9. Mahadevan MM, Trounson AO, Leeton JF. Successful use of human semen cryobanking for in vitro fertilization. Fertil Steril 1983; 40(3): 340-343.
10. Wittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryo frozen to 196°C and -269°C. Science 1972; 178: 411-414.
11. Zeilmaker GH, Alberta AT, Gent Van I, et al. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril 1984; 42: 293-296.
12. Rall WF, Fahy GM 'Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification'. Nature 1985; 313 (6003): 573-575.
13. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. Nat Med 1996; 2(6): 693-696.
14. Zeng W, Snedaker AK, Megee S. Preservation and transplantation of porcine testis tissue. Reprod Fertil Dev 2009; 21(3): 489-497.
15. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. Fertil Steril 2013; 99: 37-43.



16. Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson B et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Hum Reprod* 2011; 26: 594-603.
17. Junqueira LC, Carneiro J. Çev: AYTEKİN Y, SOLAKOĞLU S. Temel histoloji. 10. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006. 449-467.
18. Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, et al. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod* 2011; 26: 2461-2472.
19. Youm HW, Lee JR, Lee J, et al. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. *Hum Reprod* 2014; 29: 720-730.
20. Ting AY, Yeoman RR, Campos JR, et al. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. *Hum Reprod* 2013; 28: 1267-1279.
21. So-Youn Kim, Seul Ki Kim, Jung Ryeol Lee et al. Toward precision medicine for preserving fertility in cancer patients: existing and emerging fertility preservation options for women. *J Gynecol Oncol* 2016; 27(2):e22.
22. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K et al. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stemcells. *Hum Reprod* 2003; 18: 2660-2667.
23. Izadyar F, Matthijs-Rijnsenbilt JJ, den Ouden K et al. Development of a cryopreservation protocol for type a spermatogonia. *J Androl* 2002; 23: 537-540.
24. Moore KL, Persaud TVN. Çev: DALÇIK H, YILDIRIM M. Klinik yönleriyle insan embriyolojisi, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009, 244-283.
25. Tam PP, Snow MH. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1981; 64: 133-147.
26. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 2003; 262(1): 1-15.
27. Töhönen V, Ritzén EM, Nordqvist K et al. Male sex determination and prenatal differentiation of the testis. *Endocr Dev* 2003; 5: 1-23.
28. de Rooij DG and Anton GJ. Spermatogonial stem cells. *Current Opinion in Cell Biology* 1998; 10(6): 694-701.
29. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000; 21(6): 776-798.
30. Drumond AL, Meistrich ML, Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction* 2011; 142: 145-155.
31. Nagano R, Tabata S, Nakanishi Yet al. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat Rec* 2000; 258: 210-220.
32. McGuinness MP, Orth JM. Reinitiation of gonocyte mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in testes of newborn rats in vivo and in vitro. *Anat Rec* 1992; 233: 527-537.
33. Oakberg EF. A new concept of spermatogonial stem-cell renewal in the mouse and its relationship to genetic effects. *Mutat Res* 1971; 11(1): 1-7.
34. Ross MH, Pawlina W. Male reproductive system. *Histology: A Text and Atlas*. 6th ed. China: 2011. 784-828.
35. Tegelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993; 290:193-200.
36. Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002; 82(4): 825-874.
37. Russell LD, Ettlın RA, Hikim APSet al. *Histopathological evaluation of the testis*. 1st ed. Cache River Press; 1990.1-58.

38. Ji C-Y, Ohsawa S. Onset of the release of spermatozoa (spermarche) in Chinese male youth. *Am J Hum Biol* 2000; 12: 577-587.
39. Schlatt S, von Schonfeldt V, Schepers AG. Male germ cell transplantation: an experimental approach with a clinical perspective. *Br Med Bull* 2000; 56: 824-836.
40. Kervancıoğlu G, Çetinel Ş, Demirci EK et al. The effects of a seeding process on the cryopreservation of cellular suspensions of prepubertal testis. *Marmara Medical Journal* 2015; 28: 13-20.
41. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell Dev Biol* 1998; 9: 411-416.
42. Nugent D, Meirow D, Brook PF et al. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update* 1997; 3: 267-280.
43. Crabbe E, Verheyen G, Tournaye H et al. Freezing of testicular tissue as a minced suspension preserves sperm quality better than whole-biopsy freezing when glycerol is used as cryoprotectant. *Int J Androl* 1999; 22: 43-48.
44. Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A two-factor hypothesis of freezing injury evidence from Chinese hamster tissue culture cells. *Exp Cell Res* 1972; 71: 345-355.
45. Mazur P, Rall WF, Leibo SP. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophys* 1984; 6: 197-213.
46. Benson JD, Woods EJ, Walters EM et al. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 2012; 78: 1682-1699.
47. Hossain A, Nagamani M. Erkek üreme hücrelerinin dondurularak saklanması. Çev: Kervancıoğlu G, Kervancıoğlu E. *İnfertilite ve yardımcı üreme teknikleri*. Ankara: Güneş Kitabevi; 2012. 466-477.
48. Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, et al. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod* 2005; 20: 1676-1687.
49. Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B et al. Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. *Hum Reprod* 2007; 22: 1603-1611.
50. Brockbank KGM, Song YC, Khirabadi BS. Storage of Tissues by Vitrification. *Transplantation Proceedings* 2000; 32: 3-4.
51. Morris GJ, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation. *Cryobiology* 2013; 66(2):85-92.
52. Whittingham DG. Some factors affecting embryo storage in laboratory animals, Ed: Elliot K, Whelan J, *The Freezing of Mammalian Embryos*. Amsterdam: Ciba Foundation 52; 1977. 97-127.
53. Fahy GM, Wowk B, Pagotan R et al. Physical and biological aspects of renal vitrification. *Organogenesis* 2009; 5 (3): 167-175.
54. Fahy GM, Saur J, Williams RJ. Physical problems with the vitrification of large biological systems. *Cryobiology* 1990; 27(5): 492-510.