

# KRİYOBIYOLOJİ VE ÜREME ORGANI DOKULARININ DONDURULMASI

## CRYOBIOLOGY AND FREEZING OF REPRODUCTIVE ORGAN TISSUES

Ceren Yaman<sup>1</sup>, Mehmet Borga Tırpan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı  
ORCID ID: 0000-0002-5956-296X

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı  
ORCID ID: 0000-0001-8782-1108

### Yazışma Adresi:

**Mehmet Borga Tırpan**

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı  
E-posta: borgat@gmail.com

**Gönderim Tarihi:** 28 Mayıs 2019

**Kabul Tarihi:** 27 Eylül 2019

**Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi**

**ISSN: 2146-9601**

**e-ISSN: 2147-2238**

**bsbd@balikesir.edu.tr**

**www.bau-sbdergisi.com**

### Öz

Uluslararası birçok kuruluş nesli tükenmekte olan ve koruma altına alınan hayvan türlerinin gen kaynaklarını koruyabilmek amacıyla, bu konu üzerine yapılan çalışmalara destek olmaktadır. Yardımcı üreme tekniklerinin gelişen teknoloji sayesinde kullanım alanının artması, bu amaçla yürütülen bilimsel araştırmalarda genetik ilerlemenin sağlanarak genetik çeşitliliğin korunmasında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu bağlamda kriyobiyojoloji alanında kaydedilen gelişmeler düşük sıcaklıklarda hücrelerin saklanabilmesine olanak sağlamıştır. Hücresel bazda membransel yapılar düşük sıcaklıklara son derece duyarlı olmasına rağmen uygun kriyoprotektanlar kullanılarak yapılan dondurma işlemleri son derece başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Bunun yanında dokuların dondurulması hücrelerin dondurulmasına göre kriyoprotektanlar ile direkt temasın sağlanamaması nedeniyle dezavantaja sahiptir. Ancak kriyobiyojolojideki gelişmeler sayesinde bu alanda yapılan çalışmalarda ilerlemeler kaydedilmektedir. Ovaryum ve testis dokularının dondurulması, özellikle ergenliğe erişmemiş gençler, kemoterapi veya radyoterapi gören hastalar, genetik bir nedenden dolayı üreme organlarında sorunlar olan bireyler ve nesli tükenmekte olan hayvanlar açısından önemlidir. Bu amaçla aygır, tavşan, fare, koyun, inek, hamster, domuz, sığır ve inşalarda çalışmalar yapılmıştır. Sonuç olarak üreme hücreleri ve dokularının dondurulma aşamalarındaki ilerlemeler ve araştırmalar insanların ve hayvanların nesillerini devam ettirebilmeleri, genetik çeşitliliğin ve ilerlemenin sağlanması açısından büyük öneme sahiptir.

**Anahtar kelimeler:** Doku dondurulması, kriyobiyojoloji, ovaryum, testis

### ABSTRACT

International expansion will preserve the genetics of endangered and conserved animal species, supporting studies on this issue. By using the technology of assisted reproductive techniques, scientific advances have been made in the field of activation technology, management of this information, and great progress has been made in conserving genetic diversity by ensuring genetic progress. This sequence is provided in the field of cryobiology where cells can be stored at a low temperature recorded. Suitable cryoprotectants suitable for the possibility of being extremely sensitive to low temperatures on the cellular basis membranous structures are made here, resulting in extremely successful results from a distance. In addition, freezing of tissues has the disadvantage of establishing direct contact with cryoprotectants relative to freezing of cells. However, progress has been made in studies in this area of cryobiology. Freezing ovarian and testicular tissues, accessing the puberty of content, young people, chemotherapy or radiotherapy, sometimes genetically born individuals with reproductive organs and endangered people. In this month, stallions, rabbits, mice, sheep, cows, hamsters, pigs, cattle and engineers are found. As a result, these advances and researches in the reproductive environment and in the freezing stage of the tissues and the ability of the animals to sustain their generations are the first major characteristics of genetic diversity and progress.

**KEY WORDS:** Cryobiology, ovarium, testis, tissue freezing.

### GİRİŞ

Son yıllarda birçok hayvan türünün, yok olduğunun ve/veya neslinin tükenmek üzere olduğunun tespit edildiği araştırmalar yapılmıştır. Bu nedenle uluslararası doğayı koruma birliği (IUCN) hayvan türlerini koruma komisyonu, 1996 yılı verilerine dayanarak yazdığı raporda, şu an dünyada bulunan türlerin %25' inin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olduğunu, 26 memeli türünün 24' ünün yok

olmaya çok yakın olduğunu ve geçtiğimiz 100 yıl içerisinde 1000 kadar türün neslinin tükendiğini belirtmiştir<sup>1,2</sup>. Birleşmiş milletler (BM) bünyesindeki gıda ve tarım örgütü (FAO) dünyadaki gen kaynaklarının korunabilmesi için mümkün olan en çok sayıda evcil hayvan türünün yetiştiricilikte kullanılması gerektiğini açıklamıştır.

Vahşi hayvan türlerinin korunması için ise, hayvanların, yaşadıkları bölgenin ve çevrenin korumaya alınması, doğal yaşamı koruma parklarının oluşturulması ve mümkün olduğu kadar, sperma ve embriyo dondurulup saklanması gerektiğini belirtmiştir. Bu amaçla yürütülen bilimsel araştırmalarla, özellikle yetiştiricilikte kullanılan hayvanlara uygulanan suni tohumlama ve embriyo transferi yöntemleri sayesinde planlanan genetik ilerleme ve genetik çeşitliliği koruma çalışmalarında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir<sup>3,4</sup>.

İçinde bulunduğumuz yüzyıl Biyoteknoloji Çağı olarak tanımlanmakta ve suni tohumlama dünyada uygulanmış ilk reprodüktif biyoteknolojik yöntem olarak kabul edilmektedir. Biyoteknolojinin bir çalışma alanı olan gamet hücrelerinin hijyenik olarak elde edilmesi, dondurulması ve saklanabilir özelliklerinin keşfedilmesi insanları klonlayabilmeye olanak sağlayan bilgi birikimine ulaşmamızı sağlamıştır<sup>4</sup>. Bazı canlı hücrelerin ve mikroorganizmaların çok düşük sıcaklıklara dayanabildikleri ve çözme işlemi sonrasında normal fonksiyonlarına geri dönebildikleri bilgisinden yola çıkarak yapılan biyoteknolojik çalışmalarla bu bilim dalının sınır tanımaz gelişimine katkılar yapılmaktadır<sup>5</sup>.

### Kriyobiyoloji

Kriyobiyoloji, düşük sıcaklığın organizmalar üzerindeki etkilerini inceleyen bilim dalıdır. Kriyobiyoloji bilim alanı özellikle dondurma çalışmalarında kullanılan gonad hücrelerinin çözüm sonu fonksiyonel özelliklerini daha iyi anlamamızı sağlamıştır<sup>6,7</sup>. Kriyoprezervasyon işlemi ilk kez 1776 yılında, İtalyan fizyolog Spallanzani tarafından kurbağa, aygır ve insan spermaları üzerinde uygulanmıştır. Spermaların karda dondurulmasının spermatozoonları öldürmediği yalnızca geçici bir hareketsizlik yarattığı, bu yöntemle dondurulan spermalarda sıcaklık arttıkça hareketlilik tespit edildiği bulunmuş, 1938 yılında da yayınlanmıştır<sup>8</sup>. Spallanzani'nin bu buluşu, spermanın saklanması sürecinin başlangıcı olarak nitelendirilmiştir<sup>4</sup> ve ilk dondurulan hücre spermatozoon olarak adlandırılmıştır<sup>5,6</sup>. Bu keşiften sonra gametlerin dondurularak saklanması kriyoprezervasyon ile yapılmış ve bu konudaki çalışmalarda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir<sup>8</sup>. 1947 yılında da tavşan oositlerinin kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir<sup>9</sup>. Bu doğrultuda 1977 yılında dondurulup çözülen fare oositleriyle fertilizasyon ve canlı doğumlar başarılmıştır. Vitrifikasyon tekniği ise ilk olarak fare embriyolarının dondurulmasında kullanılmıştır<sup>10</sup>. Doku dondurulma çalışmalarına öncülük eden ve kriyoprezervasyonu birçok hayvan türünde başarıyla yapılmakta olan spermanın dondurulma işlemi özellikle genetik materyalin saklanabilmesi için yoğun bir

biçimde kullanılmaktadır<sup>11,12</sup>. Üreme organlarının dokularının dondurulmasında gelişmeler kaydedilebilmesi için özellikle sperma dondurulmasında oluşan reaksiyonları irdelemek önem taşımaktadır<sup>13</sup>. 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<sup>14</sup>. Gelişen faz değişimi membran içi enzimlerinin kinetiğinde değişime yol açarak, çözüm sonu canlılığını azaltmaktadır<sup>15,16</sup>. Bu değişimler sonrası, 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 arttırmakta, hücrelerin kısa ya da uzun süreli saklanması sırasında hücresel zararı doğurmaktadır<sup>17,18</sup>. Oosit ve embriyoda oluşan bozulma 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 stabilize hale gelerek soğuk şoku zararına neden olmaktadır<sup>9</sup>. 1949 yılında Polge ve ark. gliserolün kriyoprotektan özelliğini bulmasından sonra bilimsel ve modern anlamda canlı hücre dondurma çalışmaları başlamıştır<sup>8,9,19</sup>.

Günümüzde üreme hücreleri ve dokularının başarılı bir şekilde dondurulup saklanabilmesi Yardımcı Üreme Tekniklerinin gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır. Her ne kadar üreme hücreleri ve bunları içeren dokuların kriyoprezervasyonu son 50 yıl içerisinde geliştirilmiş temel bilimsel prensiplere bağlı olarak gerçekleştirilse de, sonuçları henüz bilinmeyen ve geliştirilmesi gereken pek çok teorik teknik de tartışılma konusu olmaktadır<sup>8</sup>. Hücrelere göre organların muhafazasında karşımıza çıkan en önemli sorun organların, hücre veya dokulara göre çok daha kompleks olmalarıdır. Vücudun hücreleri veya çoğu dokusu, donmuş bir halde muhafaza edilebilir, zira bu hücrelerin büyük bir kısmı çevreyle doğrudan irtibat halindedir. Bu yüzden hücreler bir bütün halinde dondurulup çözülebilirler. Organların ise ancak bir kısım hücreleri çevreyle aracsız temas halindedir.

Bu sebeple bir tarafları diğer taraflardan daha hızlı donar ve sonuçta eşit zamanlı olmayan bu donma yüzünden bütün organ tahrip olur 9-12<sup>9</sup>.

Organın hücre ve dokulara göre boyutlarının büyük olması, koruyucu kimyevi maddelerin donma gerçekleşmeden önce bütün hücrelere erişmesini engeller. Aynı şekilde erime anında organdan bu maddelerin arındırılması da güçleşir. Eğer bu kimyevi maddeler bütün hücrelere ulaşamaz veya süreç sonunda organdan uzaklaştırılmazsa organ ölür. Ayrıca bu tür maddelerle organı muhafaza etmeye çalışmak da risklidir. Miktarlarındaki artış hücreler için zehirleyici etki yapabilir. Diğer yandan dokular tek tip hücreden teşekkül etmiştir ve bu hücrelerin hepsi aynı anda donar. Organlar ise değişik yapılardaki hücrelerden oluşmuştur. Her bir farklı tip hücre, farklı sıcaklıkta donar. Bu yüzden kriyobiyologlar gerek dondurma gerekse çözündürme süreçlerinde geçen sürelerle çok dikkat etmek zorundadırlar<sup>8,20</sup>. En son problem ise en güç olanıdır. Dokular ve hücreler donduklarında bilim adamları, hücre zarlarının dışında bir miktar buzun oluşacağı beklentisi içine girerler. Gerçekten de bu buzlar görülür ve kimse onları o kadar fazla önemsemez. Ancak bu buzlar bir organın içinde ortaya çıkarsa ciddi bir durum söz konusudur. Organlar son derece düzenli yapılardır. Tek tek hücrelerden meydana gelmiş olmasına rağmen bu hücreler bir araya gelerek kompleks yapılar oluştururlar, bu yapılar da başka hücrelerle irtibat halindedir. Buz bu yapıları bozarak organı tahrip eder<sup>20</sup>.

### Doku Dondurulması

Ovaryum ve testis dokularının dondurulması, özellikle ergenliğe erişmemiş gençler, kemoterapi veya radyoterapi gören hastalar ve genetik bir nedenden dolayı üreme organlarında sorunlar olan bireyler için ve bu bireylerin fertilitelerinin korunabilmesi için büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar sayesinde doku dondurulması konusunda büyük aşamalar kaydedilmiştir. Doku dondurulmasının araştırmaya çok açık bir konu olduğu ve dondurulma prosedürlerinin geliştirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır<sup>9</sup>. Hayvanlar üzerinde yapılan hem ovaryum hem de testis implantasyon çalışmaları başarıyla uygulanmıştır<sup>9,21</sup>. Sperma ve embriyo dondurulmasındaki başarının ve elde edilen gebeliklerin yapılacak araştırmalar sonucunda doku dondurulmasında da elde edilebileceği öngörülmektedir. Doku dondurulmasında yavaş dondurma tekniği en çok kullanılan metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla

birlikte dimetil sülfoksit (DMSO) ve propanediol- sükroz en çok kullanılan kriyoprotektanlar olarak belirtilmektedir<sup>21</sup>.

### Ovaryum Dokusunun Dondurulması

Ovaryum dokusunun folikülleriyle birlikte dondurulması son zamanlarda çalışılan bir yöntemdir. Kanserli hastalar ya da otoimmün hastalıkları bulunan bireyler için fertilitenin korunması amacıyla organların dondurulma işlemi yapılmaktadır<sup>14</sup>. Bu amaçla dondurma, graft ve kültür ortamlarının hazırlanmasında model olarak hayvanlar kullanılmıştır. Model olarak kullanılan en başarılı hayvan türü olan farenin elde edilmesi ve manipülasyonu kolay, folikülogenezis periyodu kısadır<sup>22,23</sup>. Diğer bir model ise koyundur. Koyun hem fizyolojik hem de yapısal olarak insana en yakın olan modeldir<sup>24,25</sup>. Ovaryum dokusunun dondurulması oositlerin içinde bulunduğu primordial folliküllerin topluca bir doku halinde dondurulmasını sağlayan deneysel bir metottur<sup>8,26,27,28</sup>. Primordial folliküller yumurtalıkların dış yüzeyini kaplayan kortekste bulunmaktadır. Henüz olgun olmayan yumurtaları içeren bu yapıların dondurulması esastır. Primordial folikülleri içeren ovaryum korteksinin dondurulması, gametlerin saklanması ve fertilitenin korunması açısından önemlidir. Bu yöntem yumurtalığın sadece korteks kısmının küçük parçalar halinde dondurulması ya da tüm ovaryumun dondurulması şeklinde yapılmaktadır. Ovaryum dokusunun dondurularak saklandığında olası uygulama alanları, bu dokunun otograft (bireyin tekrar kendine nakil edilmesi) veya xenograftıdır (başka bir bireye nakil edilmesi). Bu transplantasyon işlemi hücrelerin in vivo maturasyonunun sağlanması için gereklidir. Ayrıca oositleri olgunlaştırmak için laboratuvar ortamında, kültür medyumları kullanılarak in vitro maturasyon işlemi de yapılabilir<sup>29</sup>. Ovaryum dokusunun dondurulmasının amacı kortekste folikülleri depolamaktır. İlk çalışmalarda sınırlı başarılar araştırmacıları, primordial foliküller içindeki immatur oositlerin dondurulmasına yöneltmiştir<sup>26</sup>. Metafaz II dönemindeki oositlerin dondurulması problemlere bağlı olarak bazı deneyler başarısızlıkla sonuçlanmıştır<sup>26,28</sup>. Fertilizasyon ve embriyonik gelişimlerde karşılaşılan, zona pellusidanın sertleşmesi sonucu prematüre korteks granüllerinin dışarı doğru açılması ve sperm penetrasyonunun gerçekleşmesindeki zorluklar gibi problemler çalışmaların hayal kırıklığı ile sonuçlanmasına neden olmuştur<sup>29</sup>.

Germinal vezikül oositlerinin dondurulması buna bir alternatif olabilir ancak bu yöntemde de zona pellusidanın kalınlaşması ve sperm penetrasyonunun engellenmesi gözlenmektedir<sup>26,28</sup>. Bu yöntem ile yapılan araştırmalarda in vitro maturasyon tam anlamıyla başarılamamıştır ve yalnızca bir doğum bildirilmiştir<sup>26</sup>. Sınırlı başarılar sonrasında araştırmalar, primordiyal folikül içerisindeki immatür oositlerin dondurulmasına yoğunlaşmıştır. Zona pellusidanın ve kortikal granüllerin olmaması, oositlerin farklılaşmalarının oldukça az olması ve organellerin sayısının az olması nedeniyle bu yöntemin daha başarılı olacağı düşünülmüştür<sup>30</sup>. Ovaryum dokusu dondurulmasında en önemli faktör soğutma derecesi, kriyoprotektanın konsantrasyonu ve soğutma sıcaklığıdır. İlk dondurma işlemi 1950' lerde yapılmış ve fare ovaryumu gliserol kullanılarak -79 °C' de saklanmıştır<sup>23</sup>. Araştırmacılar %5' lik bir folikül canlılık oranı elde ettiklerini belirtmişler; fakat sıcaklık düşüşünü kontrollü yapmamışlardır. Candy ve ark. bunun üzerine yaptıkları araştırmada sıcaklık düşüşünü kontrollü yapmışlar ve %20 folikül canlılığı oranı elde etmişlerdir<sup>31</sup>. Günümüzde uzun süreli saklama işlemi -196 °C' de yapılmaktadır. Bu derecede hücre içi kimyasal reaksiyonlar durmuş bir haldedir. Yavaş dondurma yönteminin kullanılmaya başlanması ile hücre canlılık oranı artmıştır. Standart protokol, sıcaklığın dakikada 0.3°C düşürüldüğü embriyo dondurma protokolünden köken almaktadır<sup>22</sup>. Koyun ve fare için en çok kullanılan kriyoprotektan DMSO' dur. DMSO daha az toksik olan etilen glikol, propilen glikol (PROH) ve gliseroller ile karşılaştırılırken koruyucu etki, soğutma derecesi ve canlılık değerlendirmeleri bir arada değerlendirilmelidir. Kriyoprotektanlar standart protokole olduğu gibi 1.5 M katılarak ve dakikada 0.3 °C sıcaklık düşüşü ile soğutma uygulaması yapılarak karşılaştırıldığında, canlılık oranının DMSO, propilen glikol ve etilen glikolde daha iyi olduğu insan<sup>30</sup> ve farede gözlenmiştir<sup>31</sup>. Bu çalışmayla benzer olarak başka bir araştırmada ise propilen glikol ve DMSO arasında kayda değer bir fark bulunmadığı da belirlenmiştir<sup>23</sup>. Demirci ve ark., kriyoprotektanların toksisitelerinin ve optimal dondurma koşullarının belirlenmesi amacıyla koyunlarda yaptıkları çalışmada, ovaryum kortekslerinden 2 milimetrik kesitler kullanmışlardır. Araştırmada kriyoprotektanların toksisitelerinin belirlenmesi amacıyla 1 M, 1.5 M, 2 M, DMSO ve PROH kontrol grubu olarak da kriyoprotektan katılmamış kesitler kullanmışlardır. Dondurma işlemi öncesi yapılan kontrollerde folikül ölüm oranı en iyi %3.8 ile 2 M PROH ve %6 ile 2M DMSO olarak belirlemişlerdir. Yarı otomatik dondurma cihazında kesitleri dondurmuşlar ve sonucunda folikül ölüm oranı en iyi %8,4 ile 2 M DMSO ve %1.4 ile 2 M PROH' de olduğunu, doku morfolojisinin ise en iyi 1.5 M DMSO ve

PROH' de korunduğunu belirtmişlerdir. Optimal dondurma koşullarının belirlenmesi amacıyla ise iki dondurma protokolü uygulamışlar, seeding yapılmadan dakikada 2°C düşürülerek dondurulan dokuyla, standart protokol olan ve seeding yapılarak dakikada 0.3 °C düşürülerek dondurulan dokular arasında bir farklılığa rastlamamışlardır<sup>32</sup>. Fertil oosit elde etmenin iki yöntemi vardır. Bunlar ovaryum dokusunun grafiti veya in vitro maturasyondur. Ovaryum dokusu iki şekilde grafiti edilebilir; ortotopikal olarak alındığı yerin yakınına veya çevresine örneğin; ovaryum dokusunun bursa ovarikaya transplantasyonu ya da heterotopikal olarak vücudun bir başka yerine transplantasyonu, örneğin; sırt bölgesine subkutan olarak yerleştirilmesi olarak tanımlanabilir. Transplantasyon işlemleri, transplante ovaryum dokusunda folikülogenezisi oluşturmak, in vivo ortamda oositleri geliştirmek için yapılmaktadır. Bu çalışmalar ise in vitro fertilizasyonda kullanılmak amacıyla yapılır<sup>33</sup>. Ovaryum dokusunun otografiti ilk olarak 1950' de yapılmıştır. İlk gebelik ise 1960' ta farede elde edilmiştir<sup>23</sup>. Koyunda ilk gebelik ise, Gosden ve ark., tarafından 1994' te dondurulmuş-çözdürülmüş ovaryum dokusu kullanılarak ortotopikal grafiti ile elde edilmiştir.<sup>24</sup> Dondurulmuş ve grafiti yapılmış ovaryum, farelerde 11 ay, koyunlarda 22 ay hormonal olarak aktivite gösterebilir<sup>31</sup>. Koyunda dondurulmuş ovaryum dokusunun grafiti sonucu tekrar foliküler büyüme başlangıcı sağlanmıştır. 7 hafta sonra, preantral folikül 80 µm çapında, 10 hafta sonra, antral folikül 250-300 µm çapında ve 13 hafta sonra da, ovulatorik folikül görülmüştür<sup>35</sup>. Benzer sonuçlar Baird ve ark., tarafından koyunlarda yapılan çalışmada rapor edilmiştir. Antral folikülden primer foliküle kadar gelişimin grafiti yapılmasından 80 gün sonraya kadar görüldüğü belirtilmiştir<sup>36</sup>. Ovaryum dokusunun xenografiti ise, ovaryum dokusunun başka türdeki bağışıklık sistemi baskılanmış hayvanlara naklidir. Bu yöntem de in vivo maturasyon için başarılı bir modeldir. Ayrıca folikülogenezisin gerçekleştirilebilmesi de mümkündür. Ancak preovulatorik aşamasına gelmek mümkün değildir. Bunun nedeni endojen gonadotropinlerin grafiti desteklemeye yetecek miktarda olmaması olabilir. Burada önemli olan grafitilerde damarlaşmanın yeniden sağlanmasıdır. Ovaryum anjiyogenik faktörler üretir, bunlar grafitteki endotelial hücrelerin salgı oluşturmalarını sağlar<sup>37</sup>. Baird ve ark.(1999), yaptıkları bir çalışmada, primordiyal foliküllerin sayısının düştüğünü gözlemlemiştir.

Çalışmada, taze dokunun graftında %65 primordiyal folikül kaybı olurken, dondurulmuş grafta %72 kayıp oranı görülmüştür, %7' lik folikül kaybının dondurulma aşamasında olduğunu ve en büyük kaybın yeniden damarlaşma öncesinde dokuda oluşan iskemiden kaynaklandığını vurgulanmıştır<sup>36</sup>. İn vitro maturasyon, grafta alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir. İn vitro folikülogenezisin oluşturulması ilk olarak 1965 yılında farede yapılmıştır<sup>37</sup>. Folikülogenezisin tüm aşamaları Eppig ve O'Brien tarafından yalnızca farede yapılabilmektedir. Folikülogenezisin tamamlanması için bir süreç gerekir, bu koyunlarda 6 aydan fazladır farelerde ise 22 gün sürmektedir<sup>39</sup>. Ancak henüz bu türlerde tam bir folikülogenezis gerçekleştirilememiştir. Bu süreç üç ana bölüme ayrılabilir; büyümenin başlaması, sekonder ya da primer foliküllerden antral foliküllerin oluşması ve oositin metafaz II aşamasındaki fertilizasyonu yapılabilecek oosite dönüşmesidir<sup>39</sup>. Graft yapılmış ovaryum dokusunda büyümenin başlaması yani primer folikülden primordiyal folikül oluşması inekte, babunda ve insanda başarılıdır<sup>27,40</sup>. 2003 yılında Demirci ve ark., yaptıkları çalışmada, koyunda uyguladıkları doku kültürünün ilk gününde %72.9 oranında primordiyal folikül varken, 4. gününde % 18,9 oranında primordiyal folikül olduğunu saptamışlar, primordiyal folikül sayısında önemli azalma olduğu belirtmişlerdir<sup>33</sup>. Ayrıca doku kültürünün ilk dört günü ele alındığında intermediate foliküllerin % 13.7'den % 30.3' e, primer foliküllerin % 3.8'den %27'ye, atretik foliküllerin %9.4'ten %22.9'a çıktığını bildirmişlerdir<sup>32</sup>. Yapılan diğer çalışmalarda ise preantral foliküllerin enzimatik veya mekanik izolasyondan sonra geliştiği<sup>28</sup>, kemirgenlerde sekonder folikülden başlayarak, metafaz II aşamasındaki oositlerin 14 gün sonra belirlendiği, bunların döllenebilirliğinin kontrol grubu ve uterusu bağlanmış blastositlerle benzer olduğu gözlemlendiği<sup>28</sup> ve uzun süren bir in vitro olgunlaşma sürecinden sonra metafaz II aşamasına geldiği açıklanmıştır<sup>33</sup>. Fareler üzerinde yapılan araştırmalarda, sadece birkaç araştırmacı, yaptıkları in vitro maturasyon çalışmaları ve kültür yöntemi sonucunda gebelik ve doğum elde edebilmişlerdir<sup>41</sup>. Farenin folikülogenezis sürecinin kısa olması bu çalışmalarda kullanılmasında önemli bir faktördür<sup>42,43</sup>. Koyunda yapılan çalışmalarda ise antral foliküller ve az sayıda metafaz II aşamasındaki oositler belirlenmiş ve bu belirleme sadece preantral folikül kültüründen elde edilebilmiştir<sup>25</sup>. Ovaryum korteksinin dondurulma amacı dişi gen bankası yaratmak, türleri yok olma tehlikesinden korumak ve genetik çeşitliliği sağlamaktır. Ancak hala kullanımda bazı sorunların olması folikül gelişim aşamalarının kontrol altında tutulmasına neden olmuştur<sup>33</sup>.

### Testis Dokusunun Dondurulması

Testis dokusu dondurulmasında, farklı dondurma/çözdürme protokolleri denenmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde, testis dokusundan alınan hücreler süspansiyon haline getirilip dondurulduğu ve tekrar transplante edildiğinde, testisler dejenere olduğu halde, spermatogenezisin tekrar oluştuğu gözlemlenmiştir<sup>25,44</sup>. Testis dokusunun çözdürüldükten sonra seminifer tubullere geri implante etme metodu spermatogenezisin yeniden oluşturulması için kullanılan bir yöntemdir<sup>44</sup>. Kemoterapi veya radyoterapi gören hastalar için tedavi sonrası yeniden fertilitelerini kazanmaları için önemlidir. Bu yöntem üzerinde çalışmalar hayvanlar üzerinde denenmiş, kemirgenlerde başarılı olmuştur<sup>45</sup>. Özellikle farelerde yapılan çalışmalar sonucunda, en başarılı çözüm sonu canlılık oranı elde edilen yöntemin programlı yavaş dondurma tekniği olduğu belirtilmektedir<sup>45</sup>. Kriyoprotektanlar arasında yapılan karşılaştırmada ise, karşılaştırılan DMSO, GL, EG ve propanediol-sükroze arasından en iyi olanının propanediol-sükroze ve gliserol olduğu bildirilmektedir<sup>21</sup>. Avarbock ve ark.(1996), farede yaptıkları çalışmada, testis dokusundan elde ettikleri hücre süspansiyonunu dondurmuşlardır. Kriyoprotektan olarak DMSO kullanmışlar, dondurma işlemi ise ilk önce - 70 °C' ye soğuttukları hücre süspansiyonunu 12 saat bu derecede beklettikten sonra sıvı nitrojen içine bırakmışlardır. Çözüm sonu incelemelerde hücrelerin 1/3 oranında canlılıklarını koruduklarını gözlemlemişlerdir<sup>46</sup>. Yaptıkları transplantasyon işlemi sonrası spermatogenezisin tekrar oluştuğunu belirtmişler ancak fertilizasyon ile ilgili bir açıklama getirmemişlerdir<sup>46</sup>. Ogawa ve ark., hamsterlarda 1999'da yaptıkları çalışmada, testis dokusunu dondurmuşlar ve çözüm sonu % 43 canlılık elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ancak bir farenin seminifer tubullerine yaptıkları transplantasyon işlemi sonrası spermatogenezise rastlamamışlardır<sup>45</sup>. Abrishami ve ark., 2010 yılında yaptıkları çalışmada, testis immatür dokusunu dondurmak ve saklamak için etkili stratejiler geliştirmek ve dokunun potansiyel gelişimini sürdürmesini sağlamak amacıyla, bir haftalık domuz yavrularından alınan testis dokusunu 3 farklı grupta farklı dondurma protokolü uygulayarak dondurmuşlardır<sup>47</sup>. İlk grupta tüm testis DPBS' nin içinde 4 °C' de 24, 48, 72 saat bekletilerek soğutulmuş. İncelemeler sonucunda 72 saat 4 °C' de soğutulan testis dokusu morfoloji ve in vitro hücre yaşama kabiliyeti temel alındığında, ayrıca in vivo büyüme, spermatogenezisin oluşmasının sağlanması, hücre yaşam kabiliyeti, hücrenin yapısal bütünlüğü değerlendirildiğinde, 72 saatlik kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu, belirtilen değerleri yakın olarak sürdürebildiği görülmüştür<sup>39</sup>.



İkinci grupta yavaş dondurma protokolü uygulanmıştır. 5 – 15 – 20 – 30 mg' lik testis doku parçaları farklı dondurma ortamlarında, farklı kriyoprotektanlarla karıştırılmış, DMSO, gliserol ve etilen glikol kriyoprotektan olarak kullanılarak dondurma işlemi yapılmıştır. Beraberinde 0.4 ml dondurma mediumu bulunan testis parçaları, oda sıcaklığında, 0.5 ml' lik mini payetlere çekildikten sonra programlı yavaş dondurma uygulanmıştır. Payetler 22 °C' de 10 dakika bekletilmiş, sonra dakikada 1 °C' lik düşüş sağlanacak şekilde 4 °C' ye kadar sıcaklık düşürülmüştür. Bu derecede 5 dakika bekletilmiştir. Sıcaklık, dakikada 0.3 °C azalacak şekilde 4 °C' den -8 °C' ye düşürülmüş ve bu derecede 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra dakikada 0.5 °C düşecek şekilde -8 °C' den -50 °C' ye düşürülmüş, son olarak da dakikada 10 °C düşecek şekilde -50 °C' den -90 °C' ye soğutulmuş ve bu derecedeki payetler sıvı nitrojen içine atılmıştır. Dokuların çözülmesi için 37 °C suda yaklaşık 11 saniye, buzları çözünene kadar bekletilmiş. Sonra payetin uçları kesilerek doku 2 ml' lik ilk çözündürme solüsyonunun içine boşaltılmıştır. 37 °C' de 1 dakika inkube edilmiş, daha sonra ikinci çözündürme solüsyonunda hücreler yine 37 °C' de 1-2 dakika yıkanmış ve analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak dondurulmuş-çözdürülmüş testis dokuları karşılaştırıldığında, yaşam kabiliyeti olan dokular bakımından, programlı yavaş dondurma uygulanmış ve gliserol kullanılmış olanın daha fazla yaşam kabiliyeti olan hücre içerdiği gözlenmiştir<sup>39</sup>. Üçüncü grupta ise, sükröz, etilen glikol, DMSO ve gliserol kriyoprotektan olarak kullanılmış ve 5-15-30 dakikalık sürelerde vitrifikasyon yapılması tasarlanmıştır. 5 mg' lik testis doku grupları DMSO veya gliserol içeren bir vitrifikasyon solüsyonunda ekulibrasyona, solüsyonların etkilerini belirlemek amacıyla, bırakılmıştır. 22 °C' de 10 dakika bekletildikten sonra denenecek kriyoprotektanları içeren ikinci vitrifikasyon solüsyonuna aktarılmış ve 5-15 ve 30 dakika bekletildikten sonra dokular cryovial adı verilen kaplarda vitrifiye edilmişlerdir. Çözülme aşamasında, vitrifiye dokular tanktan çıkarılmış ve oda sıcaklığında 30 saniye bekletilmiştir. Daha sonra cryovialin içine çözüm solüsyonu doldurulmuş, dokular aynı çözüm solüsyonuna aktarıldıktan sonra 37 °C' de 1 -2 dakika bekletilmiş, bu işlemin ardından mediumların içinde 1-2 dakika yıkanmıştır. Vitrifiye gruplar karşılaştırıldığında, 5 dakika DMSO ile vitrifikasyon yapılmış olan grup en iyi sonucu vermiştir. Trypan blue ile yapılan boyama sonucunda bu grup en yüksek hücre yaşam kabiliyetine sahip olan grup olarak belirtilmiştir<sup>39</sup>. Üç grupta da yapılan dondurma işlemi sonucunda çözülen testis dokuları graft edilmeleri için buzda bekletilmiş ve bağışıklık sistemleri baskılanmış farelere aktarılmıştır. Farelere 16 hafta sonra ötenazi yapılmış ve fareler incelemeye alınmıştır. Birinci grubun

xenograft dokuları incelendiğinde, bütün hepsinde üreme hücrelerinin geliştiği ve spermatogenezin olduğu gözlemlenmiştir. İkinci grup için yapılan incelemelerde, gliserol kullanılarak programlı yavaş dondurma uygulanmış testis dokusu grubunda spermatogentic hücrelerin tam olarak farklılaştığı gözlemlenmiş, bununla birlikte DMSO kullanılan grupta sadece bir kaç graft dokusunda hücreler canlılıklarını sürdürebilmiş, EG grubunda ise hiçbir hücrenin canlı kalamadığı gözlemlenmiş bu nedenle bu grup istatistiksel analizden çıkarılmıştır. Üçüncü grupta ise, yapılan histolojik değerlendirme sonucunda, gliserol ile 5 ve 15 dakikada vitrifikasyon yapılan ve DMSO ile 5 dakika vitrifikasyon yapılan gruplar en iyi doku gelişimi gösterdikleri bildirilmiştir<sup>47</sup>. Redden ve ark., 2009 yılında yaptıkları çalışmada sığır testis hücrelerini üç farklı paketlenme metodu ile dondurmuşlardır. 5 ml payet, 20 ml dondurma poşetleri ve 1.5 ml' lik cryoviallar kullanarak yaptıkları çalışmada, hücre yoğunluğunu 3, 9, 15 milyon olarak belirlemişlerdir. Dondurma sürelerini 10 ve 20 dakika sıvı nitrojen buharı olarak tasarlamışlardır. Yalnızca 20 ml' lik dondurma poşetlerini 3 ve 9 milyon yoğunlukta ve 10 dakika azot buharında dondurma yaparak incelemişlerdir. Her dokuyu dondurma mediumlarıyla zenginleştirip yıkayarak 10 dakika ekulibrasyona bırakmışlar daha sonra azot buharında dondurarak azot sıvısının içinde saklamışlardır. Çözüm sonu yapılan incelemede 5 ml' lik payetlerdeki hücre yaşam kabiliyetinin diğer 1.5 ml ve 20 ml' lik olanlara göre daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. 5 ml' lik payetler için 20 dakika dondurma zamanının 10 dakikalığa göre daha iyi olduğunu ve hücre yoğunluğunun çözüm sonu yaşam kabiliyetine bir etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak 5 ml' lik payetlerde, 3-18 milyon yoğunluktaki testis hücrelerinin nitrojen buharında 20 dakika dondurulmasını en başarılı ve en pratik sonuç olarak belirlemişlerdir<sup>44</sup>.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak üreme hücreleri ve dokularının dondurulma aşamalarındaki bu ilerlemeler ve araştırmalar insanların ve hayvanların nesillerini devam ettirebilmeleri, genetik çeşitliliğin ve ilerlemenin sağlanması açısından büyük öneme sahiptir. Her ne kadar üreme hücrelerinin dondurulmasında kullanılan yavaş dondurma ve vitrifikasyon tekniklerinde büyük ilerlemeler katedilmiş olsa da üreme dokularının dondurulmasının amacıyla yapılan çalışmalar istenilen seviyelere ulaşamamıştır. Bu bağlamda özellikle üreme dokularının dondurulması ile ilgili daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. IUCN. The World Conservation Union. Red list, Gland, Suisse (1996).
2. FAO. Food and Agriculture Organization, United Nations, Rome. Press communication 00/66 (2000).
3. Hansen LB. Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. *J. Dairy. Sci.* 83:1145-50 (2000).
4. Yavaş T. Alternatif dondurma ve saklama yöntemlerinin boğa spermaları üzerine etkisi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (2009).
5. Bozkurt, E., Tekin, N. Boğa spermalarının farklı sulandırıcılar ile dondurulması ve in vitro değerlendirilmesi. *Lal. Hay. Araşt. Enst. Derg.* 42(2):1-17 (2002).
6. Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 164:166 (1949).
7. Leibo SP, Brandley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: C Gagnon (Ed). *The Male Gamet.* Cache River Press. St Louis. sf:502-515 (1999).
8. Arthur HG, Noakes DE, Pearson H, Parkinson TJ. *Veterinary Reproduction and Obstetrics.* 7th edition. WB Saunders Company Limited. London. England. sf:634-659 (1996).
9. Balaban B. Gamete, Embryo And Tissue Cryopreservation-Thawing *Türk. Klin. J. Surg. Med. Sci.* 3(13):65-71 (2007).
10. Çetin Y. İmmatür Sığır Oositlerinin Vitrikasyon Tekniği İle Etilen Glikol Ve DMSO Kullanarak Payetlerde Dondurulması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (2004).
11. Tırpan MB, Özgöray ED, Aalemdar H, Akçay E. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) semen and fertility. *Türk J. Vet. Anim. Sci.* 40: 200-206 (2016).
12. İnanç M, Tekin K, Olğaç KT, Tırpan M, Alemdar H, Çil B, Kaya U, Stelletta C, Daşkın A. Ankara Keçilerinde bölgesel ve bireysel özelliklerin sperma dondurulabilirliğine etkisi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi.* 88(1): 39-31 (2017).
13. Tırpan MB, Olğaç KT, Gürler H, Kaya U. Effects of Different Equilibration Conditions on Cryopreserved Bovine Sperm Quality. *Kocatepe Veterinary Journal.* 10(2) 57-62 (2017).
14. Oktay K, Karlıkaya G. Ovarian function after autologous transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N. Engl. J. Med.* 342:1919 (2000).
15. Tırpan MB, Gürler H, Olğaç KT, Daşkın A. Effects of boron added bull semen extender on post-thaw spermatological parameters. *Veterinary Journal of Ankara University* 65(2),123-128 (2018).
16. Tırpan MB, Gürler H, Olğaç KT, Daşkın A. Effects of sodium pentaborate added extenders on post-thaw bovine semen kinetic parameters. *Animal Reproduction Science.* 169: 115-116 (2016).
17. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:3-22 (2000).
18. Tırpan MB, Tekin N. Effects of Boron (sodium pentaborate), added instead of Tris Components, on Freezing and Post-Thaw Quality of Angora Buck Semen. *Veterinary Journal of Ankara University* 62,295-302 (2015).
19. Yurtaydın N. *Theriogenology.* Bölüm 9. Nürol Matbaacılık A.Ş. ANKARA (1990). sf:83-87
20. Anonim Erişim Adresi: <http://www.genetikbilimi.com/genbilim/kriyo.htm>. Erişim Tarihi: 08.09.2009.
21. Hovatta O. Cryobiology of ovarian and testicular tissue. *Res. Clin. Obstet. Gynecol.* 17(2):331-342 (2003)
22. Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum. Reprod.* 2:101-6 (1997).
23. Parrott DMV. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J. Reprod. Fertil.* 1:230-41 (1960).
24. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomised sheep by ovarian autographs stored at -196 °C. *Hum. Reprod.* 9:597-603 (1994).
25. Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M. In vitro development of sheep preantral follicles. *Biol. Reprod.* 60:594-601 (1999).
26. Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil. Steril.* 70:578-9 (1998).
27. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RML. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum. Reprod.* 12:1032-6 (1997).
28. Cortvrindt R, Smits J, Van Steirteghem AC. In vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. *Hum. Reprod.* 11:2656-66 (1996).
29. Trounson AO, Kirby C. Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethylsulfoxide. *Fertil. Steril.* 52(5):778-86 (1989).
30. Oktay K, Newton H, Aubard Y, Sahla O, Gosden RG. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology. *Fertil. Steril.* 69:1-7 (1998).
31. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum. Reprod.* 15:1300-4. (2000).
32. Demirci B, Lornage J, Salle B, Franck M, Frappart L, Guerin JF. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after cryoprotectant exposure and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil. Steril.* 75:754-62. (2001).
33. Demirci B, Lornage J, Salle B, Poirel MT, Guerin JF, Franck M. The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. *Theriogenology.* 60:999-1010 (2003).
34. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum. Reprod.* 11:1487-91 (1996).
35. Aubard Y, Piver P, Cognie Y, Fermeaux V, Poulin N, Driancourt MA. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen thawed ovarian cortex in sheep. *Hum. Reprod.* 14:2149-54 (1999).
36. Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 °C. *Endocrinology.* 140:462-71 (1999).
37. Blandau RJ, Warrick E, Rumery RE. In vitro cultivation of fetal mouse ovaries. *Fertil. Steril.* 16:705-15 (1965).

38. Rone JD, Halvorson LM, Goodman AL. Ovarian angiogenesis in rabbit: endotheliotropic chemoattractant activity from isolated follicles and dispersed granulosa cells. *J. Reprod. Fertil.* 97:359-65 (1993).
39. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.* 54:197-207 (1996).
40. Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K, Winston RML. Human primordial, primary and secondary follicles in long term culture: effect of partial isolation. *Hum. Reprod.* 14:2517-24 (1999).
41. Smitz J, Cortvrindt R. Follicles culture after ovarian cryostorage. *Maturitas.* 30:171-9 (1998).
42. Cortvrindt R, Liu J, Smitz J. Validation of a simplified culture system for primary mouse follicles by birth of live young. In: *Proceedings of the XI international workshop of development and function of reproductive organs.* Ares Serono Symposium. Amsterdam. The Netherlands (1998).
43. Eppig JJ. Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev. Biol.* 60:371-88 (1977).
44. Redden E, Davey R, Borjigin U, Hutton K, Hinch G, Hope S, Hill J, Herrid M. Large quantity cryopreservation of bovine testicular cells and its effect on enrichment of type A spermatogonia. *Cryobiology.* 58:190-5 (2009).
45. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testis. *Biol. Reprod.* 60:515-521. (1999).
46. Avarbock MR, Brinster JB, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature. Med.* 2:693-696 (1996).
47. Abrishami M, Anzar M, Yang Y, Honaramooz A. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. *Theriogenology* 73(1):86-96 (2010).