



Testiküler Doku Kriyoprezervasyonu

Cumali KAYA* Melih AKAR Eser AKAL Mesut ÇEVİK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 55200 Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi: 28 Aralık 2020

Kabul Tarihi: 22 Ocak 2021

Basım Tarihi: 31 Mart 2021

Atıf yapmak için: Kaya, C., Akar, M., Akal, E. & Çevik, M. (2021). Testiküler Doku Kriyoprezervasyonu. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 6(1), 128-134.
How to cite: Kaya, C., Akar, M., Akal, E. & Çevik, M. (2021). Testicular Tissue Cryopreservation. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 6(1), 128-134.

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0666-5359>
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9160-5026>
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6563-6486>
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0754-6116>

***Sorumlu yazarın:**

Cumali KAYA
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama
Anabilim Dalı, 55200 Samsun, Türkiye.
✉: cumali.kaya@omu.edu.tr

Öz: Biyolojik dokuların vücut dışında canlılıklarını kaybetmeden yıllar boyunca saklanabilmesi kriyoprezervasyon aracılığıyla gerçekleştirilebilmektedir. Kriyoprezervasyon yoluyla dondurulacak hücreler, spermatogenezisi devam eden sağlıklı ve fertil hayvanlardan uygun metotlarla toplanarak elde edilebilmektedir. Günümüzde, erkek hayvanlardan suni vajen, elektroejakülör, el ile yapılan manipülasyonlar ve epididimal işlemler sonucu elde edilen spermanın kriyoprezervasyonu ile üreme alanında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak çeşitli nedenlerden dolayı infertilite problemi olan hayvanlarda, vahşi hayvan türlerinde ve henüz pubertaya ulaşmamış hayvanlarda sperma direkt olarak elde edilemediğinden, genetik materyalin korunması ve saklanabilmesi için farklı tekniklerin arayışı içerisine girilmiştir. Testiküler dokunun kriyoprezervasyonu, farklı hayvan türlerinde üreme kapasitesinin korunmasını ve nesli tükenmekte olan türler ile henüz pubertaya ulaşmamış hayvanlarda gametlerin uzun yıllar saklanabilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemle testiküler dokulardan elde edilen spermatozoonlar veya spermatogonial kök hücreler in vitro koşullarda gelişimini tamamlayabilir ve suni tohumlama ya da in vitro fertilizasyon gibi yardımcı üreme uygulamalarında kullanılabilir. Son 30 yılda, çeşitli türlerde başarılı sonuçların alındığı testiküler doku kriyoprezervasyonu henüz optimum materyallerin ve dondurma protokollerinin geliştirilememesinden dolayı detaylı araştırmalara açık ve reproduktif alanda başarılı ilerlemelere sebep olabilecek bir konu olma özelliği taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: İnfertilite, kriyoprezervasyon, puberta, testiküler doku.

Testicular Tissue Cryopreservation

Abstract: Biological tissues can be stored for many years without losing their viability outside the body through cryopreservation. Cells to be frozen by cryopreservation can be collected by appropriate methods from healthy and fertile animals whose spermatogenesis continues. Today, successful results have been obtained in the reproductive field with the cryopreservation of sperm obtained from male animals as a result of artificial vagina, electroejaculator, manual manipulations and epididymal procedures. However, since sperm cannot be obtained directly in animals with infertility problems due to various reasons, wild animal species and animals that have not yet reached puberty, different techniques have been sought to protect and preserve the genetic material. Cryopreservation of testicular tissue is a method that allows the preservation of reproductive capacity in different animal species and the preservation of gametes for many years in endangered species and animals that have not yet reached puberty. With this method, spermatozoons or spermatogonial stem cells obtained from testicular tissues can complete their development in vitro and can be used in assisted reproductive applications such as artificial insemination or in vitro fertilization. In the last 30 years, on testicular tissue cryopreservation, in which successful results have been obtained in various types, is open to detailed researches due to the fact that optimum materials and freezing protocols have not been developed yet and is a subject that can lead to successful advances in the reproductive field.

***Corresponding author's:**

Cumali KAYA
Ondokuz Mayıs University, Faculty of
Veterinary Medicine, Department of
Reproduction and Artificial Insemination,
55200 Samsun, Turkey.
✉: cumali.kaya@omu.edu.tr

Keywords: Cryopreservation, infertility, puberty, testicular tissue.

GİRİŞ

Mevcut bilimsel gelişmeler içerisinde üreme ve fertilizasyonun korunması her daim önemini korumuş bir konudur. Reprodüktif alandaki mevcut sorunların başında genetik materyalin uzun yıllar boyunca canlılığını yitirmeden korunabilmesi ve minimum hasarla saklandıktan sonra istenilen zamanda kullanılabilmesi gelmektedir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda fertilitenin devamlılığını sağlayabilmek için genellikle erkek ya da dişi gamet hücresi üzerine odaklanılmış ve birçok memeli türünde belirli bir aşamaya ulaşılmıştır. Bu biyoteknolojik gelişimin kilit noktası ise kriyoprezervasyon olmuştur. Kriyoprezervasyon; yapısal olarak bozulmamış hücre ve dokuların uzun süre korunması ve gelecekte kullanılması amacıyla sıfır derecenin altındaki ısılarla soğutularak bütün metabolik aktivitelerinin minimum seviyeye indirilmesi işlemidir (Wetzels vd., 1996). Üreme hücreleri ve dokularının başarılı bir şekilde dondurulup saklanabilmesi ve istendiğinde çözülebilmesi özellikle suni tohumlama ve embriyo transferi gibi yardımcı üreme tekniklerinin gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır (Tunalı, 2014).

Spermatozoonların kriyoprezervasyonu erkek hayvanlarda fertilitenin korunması için kullanılan ilk seçenektir. Günümüzde birçok hayvan türünün sperması -196 °C'de sıvı azot içerisinde yıllarca saklanabilmekte ve çözüm sonrası belirli düzeylerde fertilité ve gebelik sonuçları elde edilmektedir (Hammerstedt vd., 1990). Ancak tüm bu gelişmelere rağmen kriyoprezervasyon işlemi, spermatozoonların motilite, canlılık ve fertilité parametreleri üzerinde belirli düzeylerde negatif etki oluşturmaktadır (Wongtawan vd., 2006). Spermatozoonlar için soğutma işlemi sırasındaki buz kristallerinin oluştuğu 0°C ile -5°C ve soğuk şokuna maruz kaldıkları -5°C ile -15°C arasındaki sıcaklıklar kritik sıcaklık aralıklarıdır. Özellikle bu dönemde gelişebilecek intrasellüler dehidrasyon, membran lipid ve proteinlerinde destabilizasyon ve denatürasyon, hücre ve endoplazmik retikulumunda ozmotik şişme, plazma membranında intramembranöz kümeleşme ve akrozomal enzimlerin salınımı kriyoprezervasyonun istenmeyen başlıca olumsuz etkilerindedir (Curry & Watson, 1994). Kriyoprezervasyon işleminin spermatozoonlar üzerindeki istenmeyen olumsuz etkileri, nesli tükenmekte olan vahşi hayvan türlerinde istenilen zamanda ve düzeyde sperma alınamaması ve henüz pubertaya ulaşmamış türlerde spermatogenezisin başlamamış olmasından dolayı genetik materyalin korunması için farklı tekniklerin geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Bu noktada testiküler dokunun kriyoprezervasyonu, farklı hayvan türlerinde genetik materyalin ve fertilitenin korunmasında önemli bir biyoteknoloji olarak yerini almıştır (Oliveira, 2015).

Testiküler doku, spermatogenezis yoluyla spermatozoonları oluşturan birincil hücreler olan spermatogonyumları içerir. Bu doku kriyoprezervasyon yoluyla saklanabilir ve çözüldükten sonra in vitro olarak gelişimi devam ettirebildiği takdirde elde edilen spermatozoonlar yardımcı üreme teknikleri ile hayvan yetiştirme programlarında kullanılabilir (Yokonishi vd., 2014). Bu derlemenin amacı testiküler doku kriyoprezervasyonu hakkındaki güncel bilgileri derlemek ve hayvan türlerine göre uygun, kullanılabilir yöntemler hakkında detaylı bilgiler sunmaktır.

Testiküler Dokunun Gelişimi ve Anatomisi: Embriyonik dönemde cinsiyetin şekillenmesi 3 aşamada gerçekleşmektedir. Kromozomal olarak cinsiyetin tanımlanması olan birinci aşamada XX veya XY cinsiyet kromozomunun oluşumu fertilizasyon sırasında meydana gelmekte ve primer germ hücresini taşıyan hücrelerin mitoz bölünmesi ile devam etmektedir. Bu dönem indifferant dönem olarak adlandırılmaktadır ve erken embriyonal dönemdeki gonadlar henüz cinsiyet yönünden farklılaşmamıştır. Bu dönemden sonra eğer cinsiyet kromozomları XX ise; indifferant gonadlar ilerleyen dönemde ovaryumlara dönüşmekte, XY ise; testisler gelişmektedir. Dolayısıyla dişi memeliler homogametik iken erkek memeliler heterogametik'tirler (McGeedy vd., 2011). Bu dönemde testislerin gelişimi Y kromozomu üzerinde lokalize olan SRY gen bölgesi tarafından kontrol edilmektedir. Fenotipik cinsiyet gelişimi olarak adlandırılan üçüncü aşamada ise gonadların cinsiyet kromozomlarına göre ovaryum veya testislere farklılaşmasının ardından internal ve eksternal genital organların oluşumu başlamaktadır (Yalçın & Çevik, 2020; Wilhelm vd., 2007).

Tüm evcil erkek hayvanlarda oluşumunu tamamlayan testisler inguinal bölgede karın boşluğunun dışında bulunan skrotum adı verilen bir kese içerisinde bulunmaktadır. Ortalama testis şekilleri ve boyutları hayvan türüne, yaşa ve mevsime göre değişmektedir. (Parkinson, 2019). Testiküler doku, seminifer tubüllerden (tubuli seminiferi) ve interstisyel dokudan oluşur. Seminifer tubül, fibroblastlar, miyoid hücreler (özel düz kas hücreleri) ve lamina propria ile sınırlıdır. Lamina propria üzerinde bulunan spermatogonyumlar ve sertoli hücreleri spermatozoonların üretiminden sorumlu hücrelerdir. İnterstisyel doku (interstitium testis), kan damarlarını, lenfatik kanalları, sinirleri, bağ dokusunu ve leydig hücrelerini (endokrinokytus interstitialis) içerir. Testosteron da dâhil olmak üzere steroid hormonların üretiminden sorumlu olan leydig hücreleri, yetişkinlerde interstisyel dokunun ana bileşenidir (Amann, 2011).

Testiküler Dokunun Endokrin İşlevleri ve Spermatogenezis: Testisler, spermatogenezis ve steroidogenezis olaylarının gerçekleştiği başlıca erkek

üreme organlarıdır. Spermatogenezis, spermatozoonların üretilip depo edildiği süreci kapsarken, steroidogenezis ise testosteron gibi başlıca erkek steroid hormonlarının üretildiği süreçten meydana gelir (Weinbauer vd., 2010). Erkek üreme fizyolojisi, her ikisi de gonadotropin salgılatıcı hormona (GnRH) yanıt olarak sentezlenen, hipofiz gonadotropinleri olarak bilinen, luteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormonun (FSH) endokrin kontrolü altındadır. LH'nin en önemli etkisi, testosteron sentezi yapan Leydig hücreleri üzerinedir. Testosteron, spermatozoon üretimi, epididimiste olgunlaşması, cinsiyet bezlerinin işlevinin oluşumu ve ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişimi için gereklidir (Holdcraft & Braun, 2004). Testosteron hormonunun etkin hale gelebilmesi ve dokular üstünde androjenik etki gösterebilmesi için 5 α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona (DHT) hormonuna dönüşmesi şarttır. Testosteron, sertoli hücrelerinde ve cinsiyet bezlerinde tip-1 5 α -redüktaz ve tip-2 5 α -redüktaz adı verilen iki enzimle DHT hormonuna dönüşür (Steers, 2001). Aromatizasyona duyarlı olmayan ve testosterondan daha güçlü bir androjen olan DHT, üreme sisteminin gelişimi, sekonder cinsiyet özelliklerinin oluşumu ve cinsiyet bezlerinin aktivitesini kontrol eden bir androjen iken, testosteron ise spermatogenezisde yer alan birincil androjendir. Hem testosteron hem de DHT, tubül lümeni içinde FSH'nin uyarımı ile sertoli hücreleri tarafından salgılanan androjen bağlayıcı proteinlere (ABP) bağlanır. ABP'nin rolü, seminifer tubülün ve epididimisin lumeninde yüksek androjen konsantrasyonlarını korumaktır. FSH'nin ana hedefi, adenilat siklazla bağlantılı enzim sistemleriyle de hareket ettiği sertoli hücresidir. FSH'nin etkisi altında sertoli hücrelerinden inhibin ve ABP salgılanır. FSH, ayrıca sertoli hücresinde spermatogenezisi düzenleyen ve destekleyen birçok genden sorumludur (Walker & Cheng, 2005). İnhibin, doğrudan hipofiz seviyesinde FSH sekresyonu hakkında negatif geri bildirim neden olurken, LH üzerinde çok az etkisi vardır (Parkinson, 2019).

Spermatogenezis hayvanların pubertaya ulaşmasına yakın bir zamanda, endokrin sistemin aktivasyonu ile başlar ve testislerin seminifer tubüllerinin germinal epitelinde bulunan spermatogonia adı verilen primordial germ hücrelerinden spermatozoon üretimine kadar geçen süreci kapsar. Bu süreç üç aşamaya ayrılmaktadır. Spermatositogenezis adı verilen ilk aşama spermatogonyumun mitotik çoğalması aşamasıdır. Bu aşamada primer spermatositler ve yeni rezerv spermatogonyum oluşur. Mayozis olarak adlandırılan ikinci aşama, spermatidlerin (haploidler) üretimi için primer ve sekonder spermatositlerin mayotik bölünmelerini içerir. Üçüncü aşama veya spermiyogenezis ise spermatidlerden spermatozoonların oluşumuyla sonuçlanan bir dizi hücresel dönüşümün ve değişimin gerçekleştiği bir farklılaşma aşamasıdır (Amann, 1981).

Spermiyogenezisin başlıca olayları akrozom oluşumu, nükleer yoğunlaşma ve gerilme, sitoplazmik kasılma ve flagellum oluşumudur. Oluşan spermatozoonların depo edilecekleri epididimise ulaşabilmeleri için seminifer tubüllerin lümenine salınmasına spermiyasyon adı verilir. Tüm bu süreçler hayvan türüne, yaşa, mevsime göre değişmektedir (Busato vd., 2017).

Testiküler Doku Kriyoprezervasyonu: Çoğu vahşi ve evcil hayvan türü yasadışı avcılık, habitatların kaybı, hastalık ve infertilite gibi birçok faktör nedeniyle nesli tükenmekte olan türler olarak sınıflandırılmaktadır. Bu gibi durumlarda üreme potansiyelinin korunması ve çoğaltılması amacıyla erkek veya dişi gametlerin elde edilmesi uygun koşullarda saklanması ve daha sonra yardımcı üreme teknolojilerinde kullanılması gibi gamet koruma teknikleri geliştirilmiştir (Wildt vd., 2010). Ancak aniden ölen çoğu hayvan türünde gelişmeyen gamet hücreleri genetik materyalin korunmasına ve bu sayede türlerin devamlılığının sağlanmasına olanak sağlamamaktadır (Buarpong vd., 2013). Bu gibi durumlarda hem evcil hem de vahşi memeliler için nispeten yeni bir biyoteknoloji olan testiküler dokunun kriyoprezervasyonu üreme potansiyelinin korunmasına çözüm olabilecek potansiyel bir yöntemdir (Oliveira, 2015). Testiküler doku, spermatozoonu oluşturan birincil hücreler olan spermatogonyumları da içerir. Bu doku dondurularak saklanabilir ve çözülürldükten sonra spermatogenezis in vitro olarak tamamlanabilir. Kültür ortamından elde edilen spermatozoonlar, yardımcı üreme yöntemleriyle hayvan yetiştirme programlarında kullanılabilir (Yokonishi vd., 2014). Bu biyoteknoloji, ölen prepubertal hayvanların yanı sıra, kemoterapi gibi infertiliteye neden olabilecek uygulamalara maruz kalan türlerde de fertilitenin korunması ve devamlılığının sağlanması amacıyla uygulanabilecek alternatif yöntemlerden biridir. Kriyoprezerve edilmiş testiküler dokularda bulunan spermatogonik hücreler, testiküler dokular çözülürldükten sonra in vitro yöntemlerle gelişim süreçlerini tamamlayabilirler, bu da yüksek genetik değeri olan hayvanların fertilitite ve genetik kaynaklarının korunmasına olanak sağlar (Pukazhenthı vd., 2015).

Testisler, doku parçası veya spermatozoon süspansiyonu şeklinde kriyoprezerve edilebilmektedir. (Steirteghem, 1999). Doku parçası şeklinde yapılan kriyoprezervasyon çalışmaları, süspansiyon şeklinde yapılan kriyoprezervasyon protokollerinden daha yaygındır. Bunun sebebi seminifer tubüllerde bulunan spermatozoonların zor izole edilmesi ve bu sebeple spermatozoon sayısının azalmasına neden olmasıdır (Silber vd., 1995). Ayrıca, testiküler dokuların parçalanması esnasında hücre lizislerinden üretilen toksinler spermatozoon kalitesini olumsuz etkilemektedir (Aslam vd., 1998). Testis dokusunun kriyoprezervasyonu

anatomik olarak testisin farklı bölmelerinde farklı hücre tiplerinin bulunmasından dolayı zor bir işlemdir (Hovatta, 2000). Testiküler dokunun dondurularak saklanması; *yavaş dondurma*, *hızlı dondurma* ve *vitrifikasyon* gibi teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Ancak, günümüzde kullanılmakta olan protokoller hala birçok türde test edilmektedir (Çizelge 1) (Lima & Da Silva, 2017). Testiküler doku kriyoprezervasyon protokollerinde kriyoprotektan maddelerin kullanımı, doku çözdürüldükten sonra hücre canlılığının korunmasına yönelik önemli bir adımdır. Kriyoprotektan maddeler çözdürme işlemi sırasında hücrelerde meydana gelebilecek bazı hasarları önlerler. Çeşitli kriyoprotektan maddeler (dimetil sülfoksit, etilen glikol, propanediol, gliserol) farklı türlerde testiküler doku kriyoprezervasyon protokollerinde testiküler hücrelerin kalitesini ve yaşayabilirliğini korumak için test edilmiştir (Unni vd., 2012).

Tablo 1. Farklı hayvan türlerinde yapılan testiküler kriyoprezervasyon teknikleri (Lima ve da Silva, 2017'den uyarlanmıştır).

Table 1. Testicular cryopreservation techniques applied in different species.

Tür	Kriyoprotektan Madde	Kriyoprezervasyon Yöntemi	Sonuç
Domuz	DMSO/EG/GLY	Yavaş Dondurma Vitrifikasyon	GLY yavaş dondurulduktan sonra daha yüksek hücre canlılığı ile sonuçlanmıştır. DMSO vitrifikasyondan sonra hücre canlılığının artmasına yol açmıştır (Abrishami vd., 2010). DMSO olgunlaşmamış testis dokularında en iyi sonuç veren kriyoprotektan iken, olgunlaşmış testis dokusunda en iyi sonuç EG ile elde edilmiştir (Unni vd., 2012).
Rat	DMSO/GLY/EG	Yavaş Dondurma	Canlılık vitrifikasyondan sonra > %95, Hızlı dondurmadan sonra > %80, Yavaş dondurmadan sonra < %25 (Gouk vd., 2011).
Fare	DMSO/EG/GLY/PRO	Yavaş Dondurma Hızlı Dondurma Vitrifikasyon	DMSO/GLY kombinasyonu seminifer tubullerin morfolojisinin daha iyi korunmasını ve potansiyel hücre çoğalmasının daha yüksek bir yüzdesini sağlamıştır (Lima vd., 2017)
Evcil kedi	DMSO/EG/GLY	Vitrifikasyon	Çözüm sonrası canlılık> %68 (Barbosa vd., 2011).
Boğa	DMSO/PRO	Yavaş Dondurma	Yavaş dondurma testis dokusunu en iyi şekilde korumuştur (Pukazenthi vd., 2015).
Koç	DMSO/EG	Yavaş Dondurma Vitrifikasyon	Hızlı dondurma spermatozoon zarında küçük hasarlara neden olmuştur (Thuwanit vd., 2013)
Vahşi kedi	DMSO/EG	Yavaş Dondurma Hızlı Dondurma	

Testiküler Doku Kriyoprezervasyonunda Kriyoprotektanların Kullanımı: Kriyoprezervasyon işlemi, düşük sıcaklıklara ve ozmotik dengesizliklere maruz kalmaları nedeniyle spermatozoonlar üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Bu işlemin zararlı etkilerini en aza indirmek, dokularda bulunan organelleri korumak ve kriyoprezervasyon işleminden sonra fonksiyonel tutmak için hücre içi ve hücre dışı aktiviteye sahip kriyoprotektan maddeler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu kriyoprotektan maddeler belirli konsantrasyonların üzerinde veya altında ilave edildiğinde doku ve hücrelerde toksikasyona ya da donma hasarına neden olmaktadır (Unni vd., 2012). Çizelge 1'de belirtildiği gibi testiküler dokunun kriyoprezervasyonunda kullanılan başlıca hücre içi kriyoprotektanlar dimetil sülfoksit (DMSO), etilen glikol (EG), propandiol (PRO) ve gliserol (GLY)'dür. Hücre içi kriyoprotektanlar, düşük moleküler

ağırlığa sahiptir. Kriyoprezervasyon işlemi sırasında hücre içinde buz kristallerinin maksimum düzeyde oluşumunu engelleyerek, çözüm aşamasında hücrenin yapısının ve fonksiyonunun korunmasına yönelik etki ederler (Castro vd., 2011). Testiküler doku kriyoprezervasyon araştırmalarında kullanılan başlıca hücre dışı kriyoprotektan ise sürozdur (Baert vd., 2012). Goossens vd., (2008), prepubertal farelerin (*Mus musculus*) testis dokularının yavaş dondurma yöntemi ile dondurulduğu bir çalışmada DMSO ve etilen glikolü karşılaştırdıklarında DMSO'un çözüm sonrası seminifer tubül yapılarının daha iyi korunduğunu gözlemlemişlerdir. Abrishami vd., (2010), prepubertal domuzların (*Sus domestica*) testis dokusunun yavaş dondurulmasını içeren bir çalışmada DMSO (%75) ile kriyoprezerve edilmiş testis dokularının etilen glikol (%55) ile karşılaştırıldığında daha yüksek canlı hücre yüzdesine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Yine aynı çalışmada gliserol (%88) ile kriyoprezerve edilmiş testiküler dokular çözdürüldükten sonra en yüksek canlı hücre yüzdesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Unni vd., (2012) DMSO, etilen glikol ve gliserolün prepubertal ratların (*Rattus norvegicus*) testis dokusunun yavaş donması üzerindeki etkilerini değerlendirmiş ve DMSO'un hücrelere daha az toksik etkisi olduğunu ve gliserolün ise daha zararlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Buarpung vd., (2013), yetişkin kedilerin (*Felis silvestres catus*) testis dokusunun DMSO, etilen glikol, gliserol ve propanediol kullanarak yavaş dondurma yöntemini kullandıkları bir çalışmada çözüm sonrası membran bütünlüğünün korunması açısından en iyi sonuçların gliserol ve etilen glikol ile yapılan kriyoprezervasyondan elde edilirken en düşük düzeyin ise DMSO'dan elde edildiğini gözlemlemişlerdir.

Testiküler Doku Kriyoprezervasyon Yöntemleri: Testiküler dokuyu kriyoprezerve etmek için kullanılan en yaygın yöntemler *yavaş dondurma* ve *vitrifikasyondur* (Abrishami vd., 2010). Her iki yöntem de tür bazında optimum koşulların oluşabilmesi amacıyla farklı hayvan türlerinde ve farklı kriyoprotektan maddelerle çalışılmasına rağmen, yavaş dondurma vitrifikasyona kıyasla daha sık kullanılmaktadır (Wyns vd., 2013). Testiküler dokunun dondurulması amaçlı kullanılan bir diğer teknik ise hızlı dondurmadır (Buarpung vd., 2013). Testis fragmanlarının maruz kaldığı sıcaklığı kademeli olarak düşüren otomatik soğutma cihazları kullanılarak yavaş dondurma işlemi gerçekleştirilmektedir. Temel olarak ele alındığında hayvanlardan elde edilen testiküler doku parçacıkları ilk olarak 10-15 dakika boyunca 4 °C'de kriyoprotektan madde içeren bir denge çözeltisine maruz bırakılır. Daha sonra bu dokular kontrollü sıcaklık indirgemesine tabi tutulur ve kriyotüplere aktarıldıktan sonra ise sıvı azot içinde saklanır (Gurina vd., 2011).

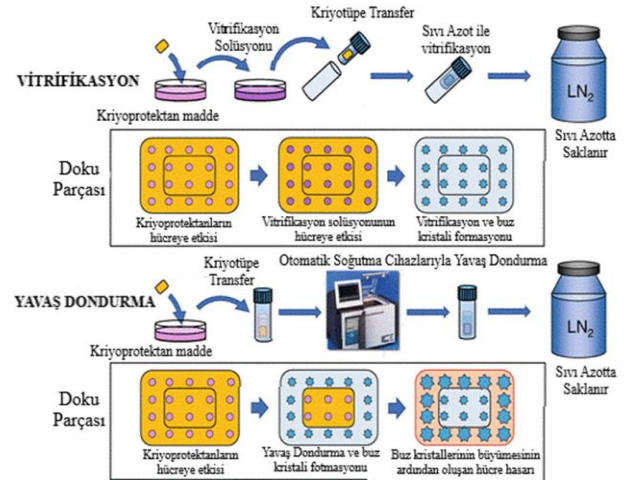
Yıldız vd., (2013), farelerin testiküler doku parçalarını yavaş donmaya maruz bırakmak için programlanabilir bir otomatik soğutma cihazı kullanmışlardır. Doku parçaları 4 °C'de denge çözeltisinde bekledikten sonra, sıcaklık 0 °C'ye ulaşana kadar her bir dakikada 1 °C'lik sıcaklık düşüşüne tabi tutulmuş ve bu sıcaklıkta 5 dakika muhafaza edilmişlerdir. Doku parçaları daha sonra sıcaklık sırasıyla -8 °C, -40 °C ve -80 °C'ye ulaşana kadar kademeli olarak soğutulmuş ve bu sıcaklıklarda farklı dengeleme sürelerinde bekletildikten sonra hemen sıvı azota aktarılmışlardır. Bu yöntem, dokuların kriyoprotektan maddelerin zararlı etkilerine daha az maruz kalmasını sağlar. Ancak, kriyoprezervasyon işlemi sırasında buz kristali oluşumu olasılığı nispeten yüksektir, bu da çözündürüldükten sonra dokunun kullanımını engelleyebilmektedir (Thuwanut vd., 2013).

Hızlı dondurma işleminde ise testiküler parçacıklar 30 dakikadan fazla denge çözeltisine maruz bırakıldıktan sonra 10 dakika boyunca sıvı azotun 4-5 cm üzerinde azot buharında tutulur ve işlemin son basamağı olarak kriyotüplere aktarılır ve sıvı azot içine daldırılır (Thuwanut vd., 2013).

Vitrifikasyon, özellikle dişi gonadal dokusunun kriyoprezervasyonunda yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Carvalho vd., 2011). Birçok vitrifikasyon tekniği olmasına rağmen testiküler doku kriyoprezervasyon araştırmalarında kullanılan teknik katı yüzey vitrifikasyondur (SSV, Solid Surface Vitrification). Bu teknik, doku fragmanlarının 5-10 dakika boyunca azaltılmış kriyoprotektan (toplam kriyoprotektan madde hacminin %50'si) konsantrasyonlarına sahip bir denge çözeltisine maruz bırakılmasıyla başlamaktadır. Parçalar daha sonra 5-10 dakika boyunca %100 kriyoprotektan içeren bir vitrifikasyon çözeltisine maruz bırakılır. Nihai kriyoprotektan madde konsantrasyonu %30'dan yüksektir (Abrishami vd., 2010). Bu işlemden sonra kriyoprotektanlarla işlem gören doku parçaları sükröz ve fetal sıgır serumu gibi kriyoprotektan maddelerle birlikte hücre kültürü ortamına ilave edilir (Baert vd., 2012). Testiküler dokular vitrifikasyon çözeltisine maruz bırakıldıktan sonra, parçalar, yalıtılmış bir kutu içinde sıvı azotun üzerinde tutulan metal bir küp içine yerleştirilir ve dokunun ultra hızlı bir şekilde soğutulmasını sağlar. Soğutulduktan sonra, bu dokular kriyotüplere yerleştirilir ve sıvı azot içinde tutulur (Lima vd., 2016). Şekil 1'de yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemlerinin dokular üzerindeki etkileri şematize edilmiştir (Suzuki, 2018).

Tüm testiküler doku kriyoprezervasyon teknikleri arasında vitrifikasyon en düşük maliyete sahip olanıdır ve gerçekleştirilmesi en kolay yöntemdir. Kullanılan ultra hızlı soğutma hızları nedeniyle kristalleşmeyi önlemede de diğer tekniklerden daha etkilidir. Bununla birlikte, dokuyu yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan maddelere

maruz bırakmak kök hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerinin korunmasına zarar verebilir (Baert vd., 2012).



Şekil 1. Yavaş dondurma ve vitrifikasyonun doku dondurmada hücelere etkileri (Suzuki, 2018).

Figure 1. Effects of slow freezing and vitrification on cells in tissue freezing (Suzuki, 2018).

Herhangi bir kriyoprezervasyon tekniğinin kullanılması, hücre yapısına zarar vererek hücre canlılığının azalmasına neden olabilmektedir. Ayrıca, bu tekniklerin kullanılmasıyla yardımcı üreme yöntemlerinde kaydedilen ilerlemeye rağmen, farklı türlerde testiküler doku kriyoprezervasyonu için ideal bir teknik hala belirlenmemiştir (Carvalho vd., 2011). Gouk vd., (2011), prepubertal farelerin testis dokusu üzerinde yavaş dondurma, hızlı dondurma ve vitrifikasyonun etkisini karşılaştıran bir çalışma yürütmüşlerdir. Çözüm sonrası hücre canlılığının vitrifikasyon grubunda (%95), hızlı dondurma grubuna (%72) ve yavaş dondurma grubuna (%24) göre daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Evcil kedilerle yapılan bir çalışmada ise Buarpung vd., (2013) yavaş dondurma ve hızlı dondurma tekniklerini karşılaştırmışlardır. Yavaş dondurma grubunda bulunan (%45,9) testiküler dokulardaki organeller, kontrol grubu (%60,3) ve hızlı dondurma grubuna (%55,0) kıyasla daha düşük bir plazma membran bütünlüğünü yüzdesi göstermişlerdir. Testis dokusunun donma hassasiyetini değerlendirmek ve farklı türlerde hangi kriyoprezervasyon protokollerinin etkili olduğunu belirlemek için farklı kriyoprezervasyon yöntemleri kullanılarak çalışmalar yapılmış, ancak çelişkili sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Bu nedenle, evcil ve vahşi hayvanların yardımcı üreme teknikleri ile çoğalmasında testiküler doku kriyoprezervasyonunun pratikte uygulanabilmesi için daha fazla araştırma yapılması, en uygun metodun belirlenmesi ve standardize edilmesi gerekmektedir (Carvalho vd., 2011).

SONUÇ

Testiküler doku kriyoprezervasyonu, prepubertal hayvanlarda ve herhangi bir nedenden dolayı spermanın elde edilemediği hayvanlarda genetik materyalin korunması ve gelecek nesillere genetik aktarımın sağlanması amacıyla uygulanabilecek önemli biyoteknolojik yöntemlerden birisi olarak değerlendirilmektedir. Çeşitli türlerde yapılan başarılı deneysel çalışmalarda dondurularak saklanan dokulardan elde edilen spermatozoonların, yardımcı üreme yöntemlerinde kullanılmasıyla gebelik ve yavrular elde edilebilmiştir. Ancak tüm bu olumlu sonuçlara rağmen kullanılacak olan kriyoprotektan maddelerin miktarı ve dokuların dondurma yöntemleri henüz tam olarak netlik kazanamamıştır. Bu nedenle testiküler doku kriyoprezervasyonunun tür bazına indirgenerek optimum koşulların oluşturulabilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ülkemizde bu konu ile ilişkili teknik alt yapının gelişmesi, araştırma ve uygulamaların sayısının artması sonucunda ekonomik kazanım sağlanması söz konusu olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abrishami, M., Anzar, M., Yang, Y. & Honaramooz, A. (2010).** Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. *Theriogenology*, *73*(1), 86-96.
- Amann, R.P. (1981).** A review of anatomy and physiology of the stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, *1*(3), 83-105.
- Amann, R.P. (2011).** Equine Reproduction, McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, E.W. & Varner, D.D. (ed), Functional Anatomy of the Adult Male, 2nd ed., 867-880p, Blackwell Publishing Ltd.
- Aslam, I., Robins, A., Dowell, K. & Fishel, S. (1998).** Isolation, purification and assessment of viability of spermatogenic cells from testicular biopsies of azoospermic men. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *13*(3), 639-645.
- Baert, Y., Goossens, E., van Saen, D., Ning, L. & Tournaye, H. (2012).** Orthotopic grafting of cryopreserved prepubertal testicular tissue: in search of a simple yet effective cryopreservation protocol. *Fertility and Sterility*, *97*(5), 1152-1157.
- Barbosa, A.P.M., Martins, C.F. & Sereno, J.R.B. (2011).** Criopreservação de células espermatogênicas bovinas utilizando diferentes moléculas protetoras. *Archivos de Zootecnia*, *60*(230), 293-296.
- Buarpong, S., Tharasanit, T., Comizzoli, P. & Techakumphu, M. (2013).** Feline spermatozoa from fresh and cryopreserved testicular tissues have comparable ability to fertilize matured oocytes and sustain the embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, *79*(1), 149-158.
- Busato, E.M., De Abreu, A.C.M.R., Bergstein-Galan, T.G., Bertol M.A.F. & Weiss, R.R. (2017).** Reproduction Biotechnology in Farm Animals Bergstein-Galan TG, (ed), Chapter 1- *Reproductive Physiology of the Equine*. 1st ed., 1-36p, Avid Science.
- Carvalho, A., Rocha Faustino, L., Ricardo de Figueiredo, J., Paula Ribeiro Rodrigues, A. & Paulo Raposo Costa, A. (2011).** Vitrification: an alternative for preserving embryos and genetic material mammalian females in cryobanking. *Acta Veterinaria Brasilica*, *5*(3), 236-248
- Castro, S.V., de Andrade Carvalho, A., da Silva, C.M.G., Faustino, L.R., de Figueiredo, J.R. & Rodrigues, A.P.R. (2011).** Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae*, *39*(2), 1-17.
- Curry, M.R. & Watson, P.F. (1994).** Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, *31*(1), 39-46.
- Goossens, E., Frederickx, V., Geens, M., De Block, G. & Tournaye, H. (2008).** Cryosurvival and spermatogenesis after allografting prepubertal mouse tissue: comparison of two cryopreservation protocols. *Fertility and Sterility*, *89*(3), 725-727.
- Gouk, S.S., Loh, Y.F.J., Kumar, S.D., Watson, P.F. & Kuleshova, L.L. (2011).** Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. *Fertility and Sterility*, *95*(7), 2399-2403.
- Gurina, T.M., Pakhomov, A.V., Kyrlyuk, A.L. & Bozhok, G.A. (2011).** Development of a cryopreservation protocol for testicular interstitial cells with the account of temperature intervals for controlled cooling below -60° C. *Cryobiology*, *62*(2), 107-114.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K. & Nolan, J.P. (1990).** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, *11*(1), 73-88.
- Holdcraft, R.W. & Braun, R.E. (2004).** Hormonal regulation of spermatogenesis. *International Journal of Andrology*. *27*, 335-342.

- Hovatta, O. (2000).** Cryopreservation of testicular tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **169**(1-2), 113-115.
- Lima, D.B.C. & Silva, L.D.M. (2017).** Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. *Ciência Rural*, **47**(11).
- Lima, D.B.C., Silva, T.F.P., Morais, G.B., Aquino-Cortez, A., Evangelista, J.S.A.M., Xavier Júnior, F.A.F. & Silva, L.D.M. (2017).** Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*, **52**, 235-241.
- McGeady, T.A., Quinn, P.J., FitzPatrick, E.S., Ryan, M.T. (2011).** *Veteriner Embriyoloji*. 1. Baskı, Malatya, Medipres Yayıncılık, 24, 263-266p.
- Oliveira, E.C.S. (2015).** Cryopreservation of testicular tissue. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **39**(1), 109-110.
- Parkinson, T.J. (2018).** Reproductive Physiology of Male Animals. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics-E-Book*, 35p.
- Pukazhenthii, B.S., Nagashima, J., Travis, A.J., Costa, G.M., Escobar, E.N., França, L.R. & Wildt, D. E. (2015).** Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. *PLoS One*, **10**(4), e0123957.
- Silber, S., Van Steirteghem, A.C., Liu, J., Nagy, Z., Tournaye, H. & Devroey, P. (1995).** High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Human Reproduction*, **10**(1), 148-152.
- Steers, W.D. (2001).** 5 α -reductase activity in the prostate. *Urology*, **58**(6), 17-24.
- Steirteghem, A.V. (1999).** Freezing of testicular tissue as a minced suspension preserves sperm quality better than whole-biopsy freezing when glycerol is used as cryoprotectant. *International Journal of Andrology*, **22**(1), 43-48.
- Suzuki, N. (2018).** Current Status of Ovarian Tissue Vitrification as a Fertility Preservation for the Young Cancer Patients. *In Cell Biology of the Ovary*, 113-121p, Springer, Singapore.
- Thuwanut, P., Srisuwatanasagul, S., Wongbandue, G., Tanpradit, N., Thongpakdee, A., Tongthainan, D. & Chatdarong, K. (2013).** Sperm quality and the morphology of cryopreserved testicular tissues recovered post-mortem from diverse wild species. *Cryobiology*, **67**(2), 244-247.
- Tunalı, U.D.G. (2014).** Sperm kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü. *Journal Agent-Androloji*, **57**, 123-128.
- Unni, S., Kasiviswanathan, S., D'Souza, S., Khavale, S., Mukherjee, S., Patwardhan, S. & Bhartiya, D. (2012).** Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant. *Fertility and Sterility*, **97**(1), 200-208.
- Walker, W.H. & Cheng, J. (2005).** FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, **130**(1), 15-28.
- Weinbauer, G.F., Luetjens, C.M., Simoni, M. & Nieschlag, E. (2010).** Physiology of testicular function. *In Andrology*. 11-59p, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wetzels, A.M.M., Bras, M., Lens, J.W., Piederiet, M.H., Rijnders, P.M. & Zeilmaker, G.H. (1996).** Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/Theory*, 229-244.
- Wildt, D.E., Comizzoli, P., Pukazhenthii, B. & Songsasen, N. (2010).** Lessons from biodiversity-the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. *Molecular Reproduction and Development*, **77**(5), 397-409.
- Wilhelm, D., Palmer, S. & Koopman, P. (2007).** Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, **87**, 1-28.
- Wongtawan, T., Saravia, F., Wallgren, M., Caballero, I., & Rodriguez-Martinez, H. (2006).** Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology*, **65**(4), 773-787.
- Wyns, C., Abu-Ghannam, G. & Poels, J. (2013).** Testicular tissue vitrification: Evolution or revolution?. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, **41**(9), 558-561.
- Yalçın, B. & Çevik, M. (2020).** Memelilerde Cinsiyetin Tayini ve Değerlendirilmesi. *Hayvansal Üretim*, **61**(1), 63-72.
- Yildiz, C., Mullen, B., Jarvi, K., McKerlie, C. & Lo, K. C. (2013).** Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal mouse testicular tissue. *Cryobiology*, **67**(1), 70-75.
- Yokonishi, T., Sato, T., Komeya, M., Katagiri, K., Kubota, Y., Nakabayashi, K. & Ogawa, T. (2014).** Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nature Communications*, **5**(1), 1-6.