

Prepubertal testis hücre süspansiyonun dondurulmasında seeding etkisi

The effects of a seeding process on the cryopreservation of cellular suspensions of prepubertal testis

Gülnaz KERVANCIOĞLU, Şule ÇETİNEL, Elif KERVANCIOĞLU DEMİRCİ, Gülçin EKTER KANTER, M. Ertan KERVANCIOĞLU

ÖZET

Amaç: Prepubertal testis kriyoprezervasyonu, kanser tedavisi yapılacak erkek çocuklarda fertilitenin korunması için günümüz teknolojisinde umut vadetmektedir. Kriyoprezervasyonda en uygun yöntemin geliştirilmesi için prepubertal testis hücre süspansiyonunda farklı taşıyıcılar kullanarak seeding etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Yedi-sekiz günlük Wistar yavru erkek sıçan testis hücre süspansiyonları, programlı yavaş dondurma yöntemiyle donduruldu. Taşıyıcı olarak seçilen yüksek güvenilirli straw ve kriyotüpe seeding uygulandı. Spermatogonyal kök hücreler ve Sertoli hücreleri üzerindeki morfolojik etki, semi-kantitatif olarak ışık, kalitatif olarak geçirimli elektron mikroskopunda incelendi.

Bulgular: Canlılık oranı, yüksek güvenilirli straw'da seeding uygulanmayan ve uygulanan gruplarda sırasıyla %90,6±3,0, %89,4±1,3, kriyotüpte %77,6±4,2 ve %85,4±2,7 bulundu. Seeding uygulanmasıyla, canlılık oranında straw grupları arasında fark görülmemesine rağmen, kriyotüp grupları arasında fark anlamlıydı ($p<0,0001$). Straw1. ve 2. grupları ile kriyotüp 3. ve 4. grupları arasında da fark anlamlıydı ($p<0,0001$ ve $p<0,05$). Spermatogonyal kök hücreler ve Sertoli hücrelerinin ışık ve elektron mikroskopik incelemesinde, nukleus ve sitoplazmik yapıların ve membranların seeding uygulanan gruplarda belirgin fark yarattığı, ayrıca yüksek güvenilirli straw'ın testis hücre süspansiyonu için kriyotüpe oranla daha üstün bir taşıyıcı olduğu görüldü.

Sonuç: Prepubertal testis hücre süspansiyonunun kriyoprezervasyonunda farklı taşıyıcılarda seeding etkisinin ilk defa kıyaslandığı çalışmamızda, taşıyıcı olarak yüksek güvenilirli

straw'ın kullanıldığı seeding uygulanan yöntemin en uygun yöntem olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Prepubertal testis, Testis hücre süspansiyonu, Programlı yavaş dondurma, Spermatogonyal kök hücre, Seeding

ABSTRACT

Objective: The cryopreservation of prepubertal testicular tissue promises to preserve fertility in boys under cancer treatment. The effects of a seeding process was investigated using different carriers for prepubertal testicular cell suspensions in order to develop an appropriate method for cryopreservation.

Materials and Methods: Testicular cell suspensions of 7-8 day old male Wistar rats were frozen by a programmed slow freezing method. The straw and cryotube selected as carriers underwent a seeding process. The morphological effects on spermatogonial stem cells and Sertoli cells were evaluated semi-quantitatively by light microscopy and qualitatively with a transmission electron microscope.

Results: The rate of vitality with or without seeding in straw was respectively, 90.6% (± 3.0), 89.4 (± 1.3) and in cryotube 77.6 (± 4.2) and 85.4 (± 2.7). The seeding process, showed no significant difference between the straw groups, but a significant difference was seen between the cryotube groups ($p<0.0001$). The nuclei, cytoplasmic structures and membranes of Sertoli and spermatogonial stem cells, showed less degeneration in the straw than in the cryotubes when the seeding process was applied.

Conclusion: In this study, we compared two carriers to observe the effect of seeding during cryopreservation of prepubertal testicular cell suspensions and found that seeding in straw was the preferable.

Keywords: Prepubertal testis, Testicular cell suspension, Programmed slow freezing, Spermatogonial stem cell, Seeding process

Giriş

Çocukluk çağı kanserlerinin tedavilerinde fertilitenin korunması halen ciddi bir sorun olarak karşımızdadır.

Gülnaz Kervancıoğlu (✉), Şule Çetinel, Elif Kervancıoğlu Demirci
Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Marmara Üniversitesi,
İstanbul, Türkiye
e-mail: gkervancioglu@gmail.com

Gülçin Ekter Kanter
Üremeye Yardımcı Tedavi Eğitim Merkezi, Süleymaniye Eğitim ve
Araştırma Hastanesi, İstanbul, Türkiye

M. Ertan Kervancıoğlu
Kadın Hastalıkları, Üremeye Yardımcı Tedavi Eğitim Merkezi, Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Gönderilme/Submitted: 11.11.2014

Kabul/Accepted: 20.12.2014

Prepubertal dönemde henüz olgun spermatozoa üretimi başlamadığından bu çocuklar semen kriyoprezervasyonundan faydalanamamaktadır. Gonadotoksik tedavi gören çocuklar için prepubertal testis dokusunun uygun teknikle dondurulup saklanması fertilitenin korunmasında iyi bir seçenek olarak gözükmektedir [1,2]. Spermatogonyal kök hücreleri (SKH) içeren prepubertal testis dokusunun kriyoprezervasyonu, bu çocuklara umut vadetmektedir [3,4]. Kriyoprezervasyon, erişkin ve prepubertal testis hücrelerinin alıcıya transplantasyonu ile spermatogenezin yeniden başlatılmasında [5-8] önemli bir aşamayı oluşturmaktadır. Ancak, henüz prepubertal testis için standart bir dondurarak saklama yöntemi bulunmamaktadır [9-12].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda prepubertal testis, ya doku parçaları [9-12] veya hücre süspansiyonu şeklinde [6,13] dondurulup saklanmaktadır. Spermatogonyal kök hücrelerin yüksek oranda yaşamalarını ve fonksiyonlarını sağlayacak dondurma yöntemiyle dondurulması [14] ve çözülmesi gerekmektedir. Kriyoprezervasyon yöntemi, testis hücre süspansiyonunda her hücre tipi için, hücrenin ihtiva ettiği su miktarı, hücrelerin büyüklüğü, şekli ve sitoplazma membranı geçirgenliği arasındaki dengeyi sağlamalıdır. Testis hücre süspansiyonunun dondurulmasında yavaş dondurma yöntemi tercih edilmektedir [6,13]. Yavaş dondurma yönteminde en önemli sorun, büyük buz kristalleri oluşmasının engellenememesidir [15]. Dondurma esnasında hücre içi buz oluşumu hücrenin ölümü ile sonuçlanabilir [16,17]. Seeding, hücrede buz çekirdeği oluşumunu azaltmak ve dokunun donmaya başladığı anda ısıyı kontrol altına almak için uygulanmaktadır [18,19]. Seeding uygulaması, metal bir forsepsle üzerinde beyaz buz çizgisi oluşana kadar taşıyıcının dıştan tutulması şeklinde yapılmaktadır.

Çalışmamızda, prepubertal testis hücre süspansiyonları programlı yavaş dondurma yöntemiyle dondurularak, farklı taşıyıcılarla seeding etkisi incelenmiştir. SKH'ler ve Sertoli hücreleri (SH) üzerindeki morfolojik etkiler ışık ve geçirimli elektron mikroskopunda değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Yedi-sekiz günlük (n=8) Wistar yavru erkek sıçanlardan, servikal dislokasyon ve dekapitasyon uygulanarak postmortem henüz inmemiş bilateral abdominal testisler çıkarıldı. Tunica albuginea çıkarıldıktan sonra her bir testis iki parçaya bölünüp hücre süspansiyonu oluşturmak üzere enzimatik ayrıştırma yapıldı. Seminifer tubulusta Sertoli hücreleri bazal laminaya hemidesmozomlarla, birbirlerine

desmozomlar, gap junction'lar ve kan-testis bariyerini oluşturan sıkı bağlantılarla bağlıdır. Sertoli hücreleri, germ hücrelerine, desmozom benzeri yapılar, aralık bağlantılar, ektoplazmik uzantılar ve tubulobulbar komplekslerle bağlanmaktadır. 7-8 günlük prepubertal testiste oluşmaya başlayan bağlantılar [20] iki aşamalı enzimatik ayrıştırma ile ortadan kaldırılarak hücrelerin serbestleşmesi sağlandı. Çalışmamız için Etik Kurul onayı alınmıştır.

İki aşamalı enzimatik ayrıştırma ile hücre süspansiyonu oluşturma

Hücre süspansiyonu oluşturmak için ilk aşamada 0,4 mg/ml tip IV kollajenaz (C 1889 Sigma-Aldrich, US) ve 0,02 mg/ml DNAaz (DN25 Sigma-Aldrich, US) içeren Dulbecco's modified eagle medium (DMEM+F12) (D8062 Sigma-Aldrich,US) kullanıldı. İkinci aşamada 0,5 mg/ml tripsin 0,2 mg/ml etilendiaminotetraasetat (EDTA) (T4299 Sigma-Aldrich,US) kullanıldı. DMEM+F12 ile 2 kere yıkanarak hücre süspansiyonu elde edildi.

Prepubertal testis hücre süspansiyonları, bir gruba seeding uygulanıp diğer gruba seeding uygulanmadan 2 farklı programlı yavaş dondurma yöntemi ile donduruldu. Taşıyıcı olarak dondurma çubuğu (yüksek güvenlikli straw) veya dondurma tüpü (kriyotüp) kullanıldı. Böylece gruplar;

1. Grup SS(-): Straw, Seeding(-)
2. Grup SS(+): Straw, Seeding(+)
3. Grup KS(-): Kriyotüp, Seeding(-)
4. Grup KS(+): Kriyotüp, Seeding(+) şeklinde oluşturuldu.

Programlı yavaş dondurma yöntemi

Dondurma solüsyonu olarak 1,5 mol/l dimetil sülfoksit (DMSO) (d2650 Sigma-Aldrich, US), 0,07 mol/l sukroz (840097 Sigma-Aldrich, US) ve % 10 fetal bovin serum (FBS) (F6178 Sigma-Aldrich, US) içeren DMEM+F12 (D8062 Sigma-Aldrich, US) kullanıldı. Programlı soğutucu olarak Planer series-3 (Planer Products, UK) kullanıldı.

Oda ısısından 2°C'dk'da hızla ısı -7°C'ye indirildi. Isı -7 °C'ye geldiğinde 5 dakika beklendi. Bu aşamada 2. ve 4. gruba seeding uygulandı. -7 °C'den -30 °C'ye 0.3 °C/dk hızla soğutuldu. Sonra -150 °C'ye 10 °C/dk hızla soğutularak donduruldu. Taşıyıcılar -196 °C'deki sıvı azot tankına yerleştirildi.

Çözülme işlemi için, örnekler 37°C'deki su banyosuna alındı. Azalan konsantrasyondaki DMSO, sukroz ve FBS ile yıkandı. %10 FBS içeren DMEM+F12'de 30 dakika inkübasyon uygulandı.

Canlılık testi (Eosin-Y boyası)

Testis hücre süspansiyonundan lam üzerine bir damla konup üzerine de bir damla % 0,5'lik Eosin-Yellow (E0201 Surechem products, UK) damlatılıp boyandı. Bu boyamada canlı hücreler boya almadı, ölü hücreler kırmızı boyandı. Her grup için beş örnekleme yapıp her örnekten en az 200 hücre iki ayrı araştırmacı tarafından sayıldı. Her grupta toplam hücre sayısına göre canlı hücre oranları belirlendi [21].

Testis hücre süspansiyonundan santrifüj işlemi ile hücre peleti oluşturuldu. Pelet rutin geçirimli elektron mikroskobu takibine alındı.

Geçirimli elektron mikroskobu preparasyonu

Testis hücre süspansiyon peleti 0,1 M fosfat tamponu ile tamponlanmış % 2,5 glutaraldehit fiksatifinde 4-12 saat süreyle + 4°C'de fiks edildi. Tampon ile yıkandıktan sonra aynı tampon çözeltisi içindeki %1'lik Osmium tetroksit ile 1 saat ikinci fiksasyon yapıldı. %70, %90, %96, %100 yükselen alkol serisinden ve propilen oksitten geçirip suyu alındı. Hücre peleti daha sonra blok kapsüllere yerleştirilip üzerlerine epon 812 konularak gömme işlemi yapıldı. Eponun polimerizasyonu için 60°C etüvde 24 saat süreyle bekletilip bloklandı. Epon bloklardan Leica Ultracut R ultramikrotomda, cam bıçakla 1000 nm'lik yarı ince kesitler alındı. Yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskobunda (Olympus BX51, Olympus Corporation, Japan) incelendi. Epon bloklardan hazırlanan 60 nm'lik ince kesitler geçirimli elektron mikroskobunda (Jeol TEM 1200 EXII-Japan) incelendi.

Kesitlerin histolojik değerlendirilmesi

Işık mikroskobu değerlendirmesinde, SH'leri ve SKH'lerin nükleuslarında heterokromatin dağılımı, nükleolusun ayırt edilebilmesi, nükleus şekli, piknotik değişiklikler ile sitoplazmalarında, sitoplazmik vakuolüzyon, dejenerasyon incelendi. Semi-kantitatif olarak değerlendirildi [22]. Gruplar üzerindeki donma-çözme etkileri orta derecede korunmuş (++) , iyi korunmuş (+++) ve çok iyi korunmuş (++++) olarak sınıflandırıldı.

Geçirimli elektronmikroskobunda değerlendirme kalitatif olarak yapıldı. Endoplazmik retikulumların (ER) şişip genişlemesi, mitokondrilerde yoğun görünüm, nükleuslarda hafif ve orta derecede heterokromatin yapısının görülmesi geri dönüşümlü (reversible) değişiklikler olarak kabul edildi. Mitokondrilerde atılmış yün görünümü, ER'de aşırı şişme genişlemeyle birlikte sitoplazmada geniş vakuollerin oluşması, nükleuslarda piknoz, nükleus membranlarında ayrışmalar ve ondülasyonlar geri dönüşümsüz (irreversible) değişiklikler olarak kabul edildi [23,24].

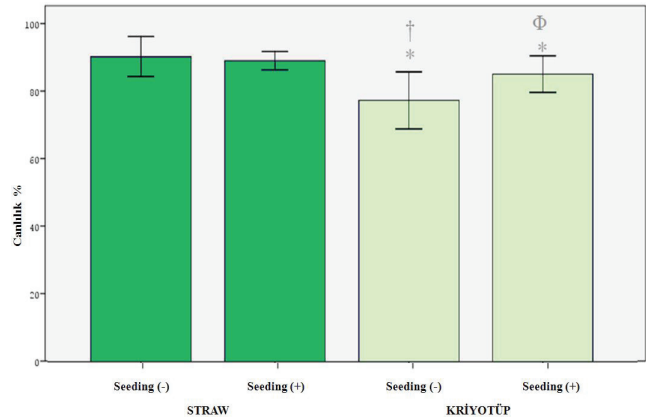
İstatistiksel analiz

Canlılık testi için ki-kare testi uygulanıp SPSS 17 istatistik programı kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Canlılık testi değerleri

1. Grup SS (-): %90,6±3,0; 2. Grup SS (+): %89,4±1,3; 3. Grup KS (-): %77,6±4,2; 4. Grup KS (+): %85,4±2,7 bulundu. Canlılık testi sonuçlarına bakıldığında 1. grup sayısal olarak en yüksek değeri verdi. 1. grupta sayısal değer 2. gruba oranla daha yüksek olmasına karşılık aralarında istatistiksel olarak fark görülmedi. 3. ve 4. gruplar kıyaslandığında ise aralarında istatistiksel olarak fark görüldü ($p < 0,0001$). 1. grup ile 3. ve 4. gruplar arasında fark anlamlı (sırasıyla $p < 0,0001$ ve $p < 0,05$) olduğu gibi 2. gruba 3. ve 4. gruplar arasında da fark anlamlı (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,05$) bulundu (Şekil 1).



Şekil 1. Straw ve kriyotüpte seeding uygulamasıyla canlılık oranlarının karşılaştırılması. * = Straw Seeding (-) ile kıyaslandığında ($p < 0,0001$) † = Straw Seeding (+) ile kıyaslandığında ($p < 0,001$) Φ = Kriyotüp Seeding (-) ile kıyaslandığında ($p < 0,005$). Error Bars: +/- 2 SD.

Işık mikroskobu bulguları

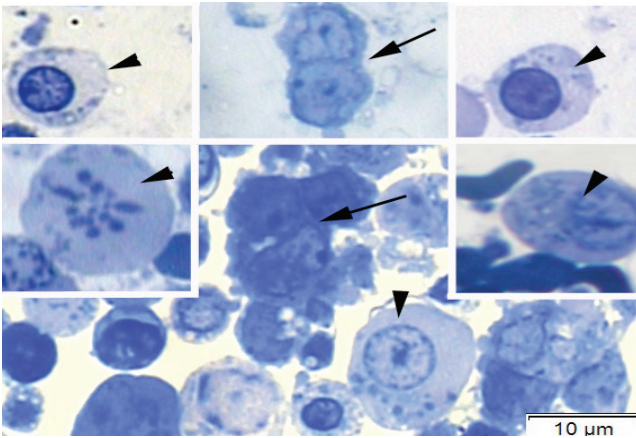
Tablo I: Prepubertal testis hücre süspansiyonunun dondurulmasında seeding ve taşıyıcının SKH'ler ve SH'ler üzerine etkisi. (Semi-kantitatif değerlendirme).

	Spermatogonyal Kök Hücre	Sertoli Hücresi
1.Grup: SS (-)	(+++)	(+++)
2.Grup: SS (+)	(+++)	(++++)
3.Grup: KS (-)	(++)	(+++)
4.Grup: KS (+)	(++)	(++++)

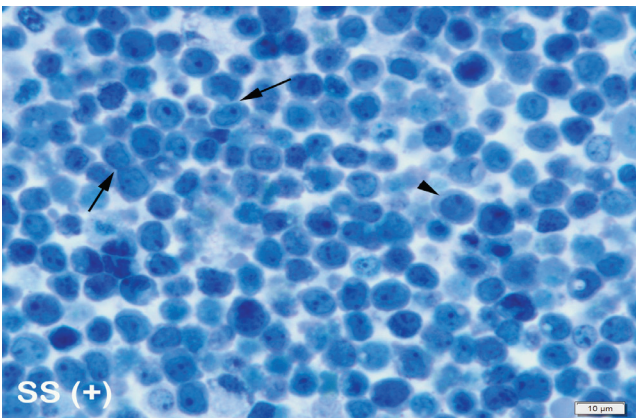
Çok iyi korunma (++++), İyi korunma (+++), Orta derecede korunma (++)

Her iki straw grubuna bakıldığında, SKH'ler benzer olarak iyi derecede, SH'ler ise SS(+) grubunda çok iyi derecede korundu. Her iki kriyotüp grubunda ise; SKH'lerin sitoplazma ve nukleuslarında bozulmalar benzer seviye göstererek hücreler orta derecede korundu. SH'lerin ise KS(+) grubunda çok iyi derecede korunduğu görüldü (Tablo I).

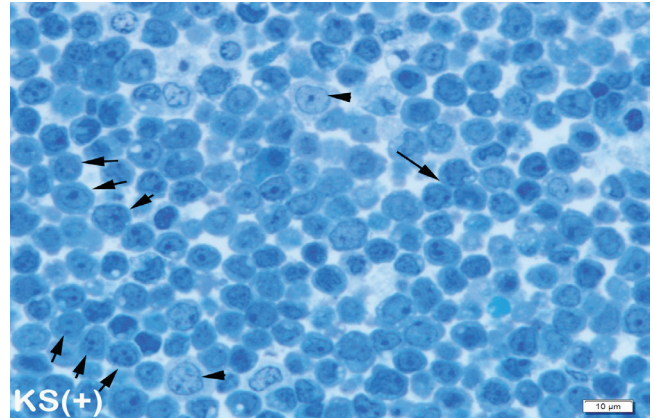
Prepubertal testis hücre süspansiyonunun kriyoprezervasyonunda seeding etkisini gözlemek için kriyoprezervasyon uygulanmamış kontrol grupta düzgün SKH ve SH'ler gözlemlendi (Şekil 2a). SS(+) (Şekil 2b) ve KS(+) (Şekil 2c) gruplarında, SS(-) (Şekil 2d) ve KS(-) (Şekil 2e) gruplarına oranla hücrelerin belirgin olarak daha iyi korunduğu izlendi. Her dört gruptan hazırlanan preparatlarda her seviyede korunma farklılığı gösteren hücreler mevcuttu. Ancak seeding uygulanmayan SS(-) ve KS(-) gruplarının hücrelerinde morfolojik bozulmalar daha belirgindi. Sitoplazmik vakuolizasyon hakimiyetinde piknotik nukleuslar şeklinde bozulmalar belirgindi.



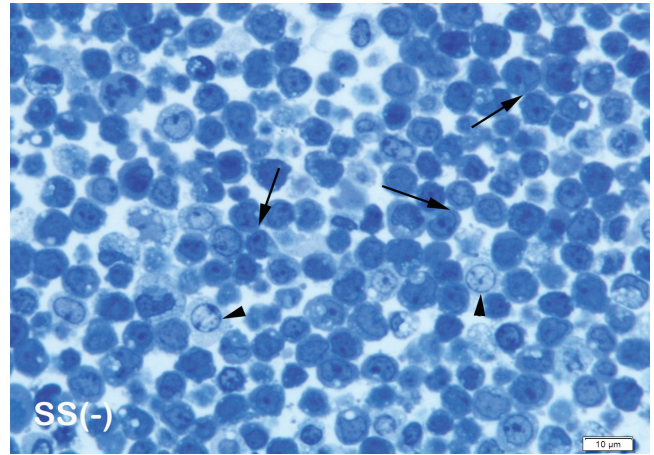
Şekil 2a: Prepubertal testis hücre süspansiyonu kontrol grubunda düzgün sitoplazma ve nukleusa sahip SKH'ler (okbaşı) ve SH'leri (ok). Toluidin mavisi.



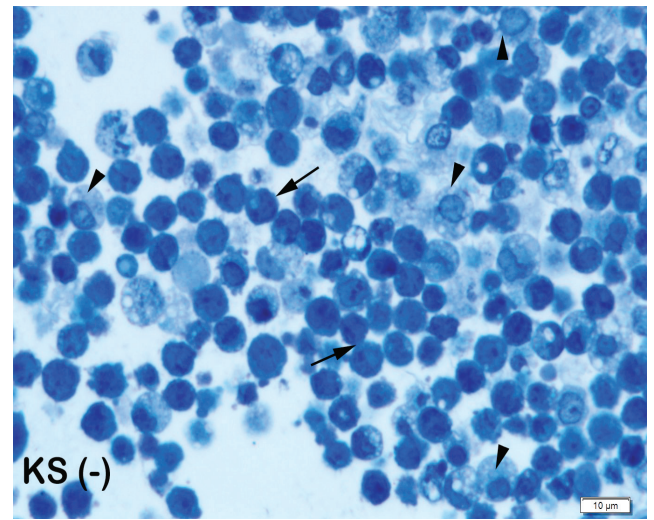
Şekil 2b: Seeding uygulanan straw SS(+) grubunda iyi derecede korunan SKH'ler (okbaşı), çok iyi derecede korunan SH'leri (ok). Toluidin mavisi.



Şekil 2c: Seeding uygulanan kriyotüp KS(+) grubunda orta derecede korunan SKH'ler (okbaşı) ve çok iyi derecede korunan SH'leri (ok).Toluidin mavisi.



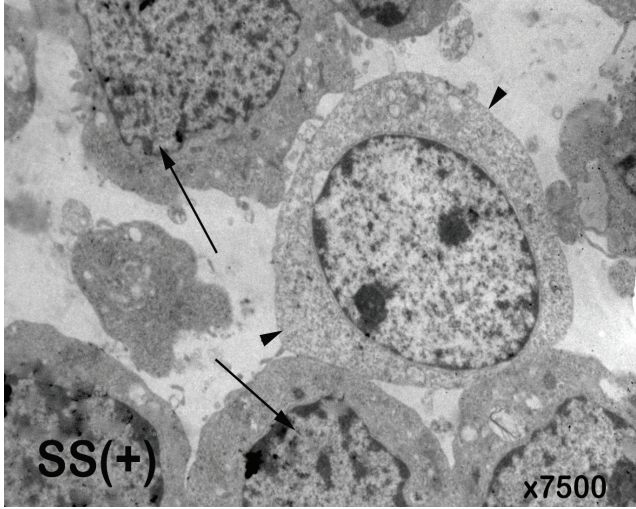
Şekil 2d: Seeding uygulanmayan straw SS(-) grubunda iyi derecede korunan SKH'ler (okbaşı) ve SH'leri (ok).Toluidin mavisi.



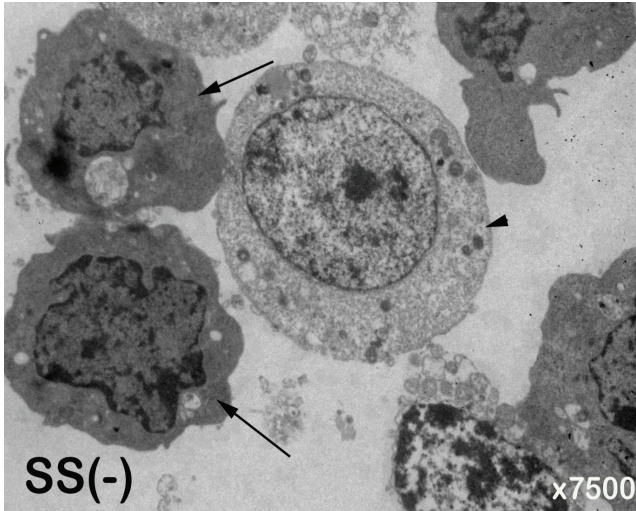
Şekil 2e: Seeding uygulanmayan kriyotüp KS(-) grubunda belirgin sitoplazmik vakuolizasyon gösteren orta derecede korunan SKH'ler (okbaşı) ve iyi derecede korunan SH'leri (ok).Toluidin mavisi.

Geçirimli elektron mikroskop bulguları

Yüksek güvenilirli straw gruplarında; SKH'lerde sitoplazmik vakuolüzyon, endoplazmik retikulumda şişme, krista yapıları korunarak mitokondrilerde şişme, nukleuslarda hafif ve orta derecede heterokromatin oluşumu ile birlikte genel olarak hücre membran yapılarının korunduğu, SKH ve SH'lerde hafif ve orta derecede dönüşümlü değişikliklerin olduğu görüldü (Şekil 3a, 3b).



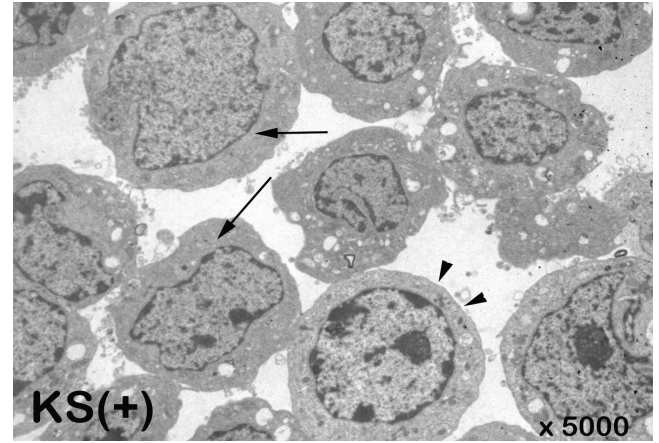
Şekil 3a: Seeding uygulanan straw SS(+) grubunda SKH'ler (okbaşı) ve SH'lerinde (ok) sitoplazmik vakuolüzyon, endoplazmik retikulumda şişme, nukleuslarda hafif derecede heterokromatin, korunmuş membran yapıları görülmektedir.



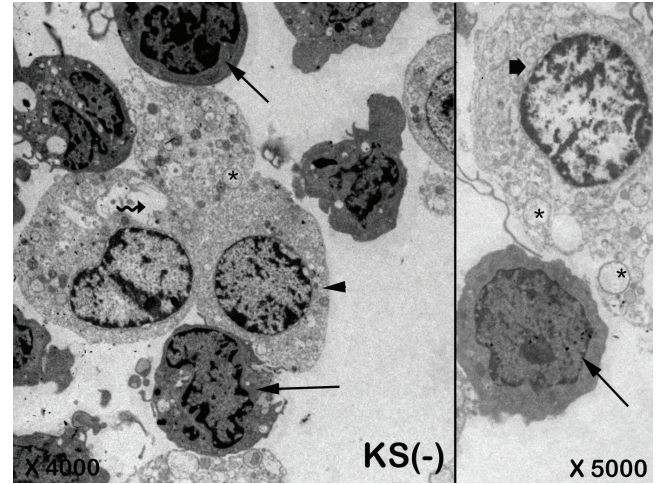
Şekil 3b: Seeding uygulanmayan straw SS(-) grubunda hafif derecede reversible değişiklikler gösteren SKH'ler (okbaşı) ve SH'leri (ok).

Kriyotüp seeding uygulanan grupta da SKH'lerde sitoplazmik vakuolüzyon, endoplazmik retikulumda

ve mitokondrilerde şişme, nukleusta heterokromatin yapısı görüldü. SH'lerinde ise membran yapılarının korunduğu ve bu tipteki hücrelerin çoğunluğu oluşturduğu izlendi (Resim 3c). Kriyotüp seeding uygulanmayan grupta ise membran yapılarında ileri derecede bozulma, mitokondrilerde krista kaybı ile birlikte aşırı şişme (atılmış yün görünümü), sitoplazmada geniş vakuoller ve dağılma, nukleuslarda piknoz, nukleus membranlarında çentiklenme ve ondülasyonlarla birlikte ağır dejenerasyon gösteren SKH'lerin çoğunlukta olduğu izlendi (Şekil 3d)



Şekil 3c: Seeding uygulanan kriyotüp KS(+) grubunda: SKH'de (okbaşı) sitoplazmik vakuolüzyon, endoplazmik retikulumda şişme, mitokondrilerde şişme, nukleusta heterokromatin oluşumu, SH'lerinde (ok) korunan ince yapı.



Şekil 3d: Seeding uygulanmayan kriyotüp KS(-) grubunda: SH'lerinde (ok) sitoplazmik vakuolüzyon, mitokondrilerde şişme ve nukleuslarda orta derece heterokromatin oluşumu, SKH'lerde (okbaşı) membranlarda ileri derecede bozulma, mitokondrilerde krista kaybı ile birlikte aşırı şişme-atılmış yün görünümü (*), sitoplazmada geniş vakuoller (kırık ok) ve dağılma, nukleuslarda piknotik değişiklikler, nukleus membranlarında çentiklenme ve ondülasyonlar (kalın ok) ile birlikte ağır dejenerasyon görülmektedir.

Geçirimli elektron mikroskop incelemelerinde SKH'lerde membran yapısının SH'lere oranla kriyoprezervasyondan daha fazla etkilendiği dikkati çekti. SH'lerin ince yapısının daha iyi korunduğu ve seeding uygulanan gruplarda bu korunmanın daha belirgin olduğu görüldü (Resim 3a, 3c). Gruplara göre ince yapıdaki etkilenme derecesi, ışık mikroskobu bulgularımızla paralellik gösterdi.

Tartışma

Prepubertal testisin doku olarak kriyoprezervasyonunda en uygun yöntemi ortaya koymak için yapılan çeşitli çalışmalarda farklı medyumlar, farklı kriyoprezervasyon yöntemleri ve seeding etkisi incelenmiştir [9,10,12,25]. Ancak prepubertal testis hücre süspansiyonunda farklı taşıyıcılarla birlikte seeding etkisi araştırılmamıştır.

Testis doku olarak dondurulduğunda, doku bütünlüğü korunduğu için hipoksiye tek hücreye oranla daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir [26]. Ancak doku hücre bağlantılarının korunması nedeniyle hücre süspansiyonuna kıyasla daha fazla permeable kriyoprotektan gerektirmektedir [27]. Fazla kriyoprotektan kullanımının ise hücrelerde toksik etkinin artmasına neden olduğu bildirilmektedir [28]. Ayrıca, testisin hücre süspansiyonu şeklinde dondurulmasının doku olarak dondurulmasına kıyasla, hücre canlılığını daha iyi koruduğu da belirtilmektedir [29]. Bu nedenle, çalışmamızda prepubertal testis dokusunu hücre süspansiyonu olarak dondurmayı tercih ettik.

Testis hücre süspansiyonu şekli, büyüklüğü ve su içeriği farklı hücre tiplerini içerdiğinden hücrelerin canlılığı ve fonksiyonunun korunmasını sağlayacak optimal dondurma şartları gerekmektedir. Hücrelerin daha sonra transplante edileceği de düşünülürse kriyoprezervasyon tekniği önem kazanmaktadır. Uygulanacak kriyoprezervasyon protokolleri SKH'lerin optimal korunmasını sağlamalıdır [7]. Prepubertal testis hücre süspansiyonu kriyoprezervasyonunun optimizasyonu için az sayıda çalışma mevcuttur [13].

Prepubertal testis hücre süspansiyonu dondurma çözme sonrası canlılık testi sonuçlarımızda yüksek güvenilirli straw grupları arasında seeding uygulamasının anlamlı fark oluşturmadığını gördük. Oysa kriyotüpte canlılık oranının seeding uygulanmasıyla anlamlı şekilde yükseldiğini izledik. Bunu, seeding uygulamasının çapı geniş olan kriyotüpte ısının kontrol altına alınmasını sağlaması ve hücrelerin de bundan olumlu şekilde etkilenmesiyle açıklayabiliriz. Seeding kriyotüpte, yüksek güvenilirli straw'a oranla daha belirgin olarak etkili olmuştur. Dar çaplı yüksek güvenilirli straw'da ise ısının her noktaya daha homojen dağılması

nedeniyle seeding uygulamasının canlılık oranında anlamlı bir fark oluşturmadığını söyleyebiliriz. Bulgulara bakıldığında, canlılığın korunması açısından, prepubertal testis hücre süspansiyonu için yüksek güvenilirli straw'ın kriyotüpe üstün bir taşıyıcı olduğunu gördük.

Prepubertal testisin doku olarak kriyotüpte dondurulması sonrası hücrelerin canlılığının ve fonksiyonlarının seeding uygulanmayan grupta, seeding uygulanan gruba oranla daha iyi korunduğunu bildiren araştırmalar mevcuttur [12,25]. Bu bulguların bizim kriyotüp bulgumuzla uygunluk göstermemesini, araştırmalarda fare testisinin bütün doku olarak dondurulmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Hücrelerin nükleus ve sitoplazmik morfolojik özelliklerinin karşılaştırılmasında, yüksek güvenilirli straw gruplarında SKH'ler benzer olarak iyi derecede ve SH'ler ise seeding uygulanan grupta çok iyi derecede korunmuştur. Kriyotüp gruplarında ise SKH'ler orta derecede ve SH'lerin seeding uygulamasıyla çok iyi derecede korunduğu izlenmiştir. Buna göre SKH'lerin taşıyıcı olarak yüksek güvenilirli straw'da daha iyi korunduğunu ancak seeding uygulamasından pek etkilenmediğini, SH'lerin ise taşıyıcı farkı olmadan seeding uygulamasından daha fazla etkilenerek iyi korunabildiğini gördük. SH'lerin seeding uygulanmasından etkilenmesini, SKH'lere oranla daha büyük hücreler olması ve seeding uygulamasıyla buz kristallerinin kontrol altına alınmasının büyük hücreyi daha fazla etkileyebileceği ile açıklayabiliriz.

Genel olarak SH'lerin SKH'lere oranla daha iyi korunmasını ise; SKH'lerin proliferatif aktivitesinin yüksek olması nedeniyle [30] dış etkenlerden daha fazla etkilenmesiyle açıklayabiliriz. Ancak bu etkilenmenin daha ileriki aşamalarda olumlu sonuçlara neden olduğu bildirilmektedir [6,31]. SKH'lerin kendini yenileme potansiyeli yüksek olduğu için, kriyoprezervasyon sonrası transplantasyonu konsantrasyonunun taze testistekine oranla daha yüksek olmasına neden olduğu bildirilmektedir [6]. Aynı şekilde SKH'lerin testiküler somatik hücrelere oranla kriyoprezervasyon sonrası yaşamını daha iyi sürdürebildiği belirtilmektedir [30]. Hücre süspansiyonunda SH'lerin de korunması önemlidir. SH'ler seminifer tubuluslarda hücre bağlantıları oluşturarak gelişen germ hücrelerini destekler, beslenmelerini sağlar ve aktif olarak spermatogenezde rol oynar [32,33]. Hücre süspansiyonunun ileri aşamada transplantasyonu düşünüldüğünde SH'lerin, SKH'lerin yaşamları için gerekli olduğu aşikârdır.

TEM incelemelerinde, SKH'leri ve SH'lerin SS(+)

grubunda hücre membran yapılarının diğer gruplara oranla daha iyi korunduğu dikkati çekmiştir. KS(-) grubunda sitoplazmik vakuolüzyon ve dejenerasyonun daha fazla görülmesi, hücre membran yapılarındaki bozulmanın diğer gruplara oranla daha belirgin olmasına bağlanmıştır. Seeding uygulaması, hücrelerin nükleus sitoplazma ve membran yapılarında korunmayı olumlu yönde etkilemiştir. Yüksek güvenlikli straw çapının dar olması nedeniyle ısının daha homojen dağılması, hücre morfolojisi ve membran yapılarının korunmasında etkili olmuştur. Yüksek güvenlikli straw'da seeding uygulamasının canlılık testinde anlamlı fark yaratmamasına karşılık membran yapılarını ve hücre morfolojisini daha iyi koruduğu görülmüştür.

Çalışmamızda birçok araştırmacının kullandığı dondurma medyumunu DMSO [11,12, 24,34,35] tercih edilmiştir. DMSO bizim araştırmamızda da iyi sonuç vermiştir. Sonuçların daha da iyileştirilmesi için farklı taşıyıcı ve seeding etkisini araştırdığımızda canlılık testi neticelerinin ve hücre morfolojilerinin iyi korunmasının fikrimizi desteklediğini gördük.

Bu çalışmada prepubertal testis hücre süspansiyonunda, farklı taşıyıcılar kullanarak, seeding etkisini inceledik. Seeding yanısıra taşıyıcıların da prepubertal testis süspansiyonunda hücrelerin korunmasında etkili olduğunu gördük. Buna göre prepubertal testis hücre süspansiyonu için yüksek güvenlikli straw'ın kriyotüpe oranla daha üstün bir taşıyıcı olduğunu gösterdik.

Çalışmamız, prepubertal sıçan testis hücre süspansiyonunda farklı taşıyıcılar kullanarak seeding etkisini ışık ve elektron mikroskopik olarak gösteren ilk çalışmadır. Elektron mikroskopik gözlemlerimizde seeding etkisi hem sitoplazmik hem de hücre membranı seviyesinde detaylı olarak ortaya konmuştur. Prepubertal erkeklerde fertilitenin korunması amacı ile prepubertal testis hücre süspansiyonunun dondurulmasında en uygun yöntemin, programlı yavaş dondurma yönteminde taşıyıcı olarak yüksek güvenlikli strawın kullanıldığı, seeding uygulanan yöntem olduğu görülmüştür. Prepubertal testis hücre süspansiyonunun kriyoprezervasyonunu takiben transplantasyon uygulanan araştırmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- Orwig KE, Schlatt S. Cryopreservation and transplantation of spermatogonia and testicular tissue for preservation of male fertility. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;34:51-6. doi:10.1093/jncimonographs/lgi029
- Schlatt S, Ehmcke J, Jahnukainen K. Testicular stem cells for fertility preservation: Preclinical studies on male germ cell transplantation and testicular grafting. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:274-80. doi:10.1002/pbc.22002
- Goossens E, Tournaye H. Is there a clinical future for spermatogonial stem cells? *Curr Stem Cell Res Ther* 2007;2:189-95. doi:10.2174/157488807781696258
- Wyns C, Curaba M, Petit S, et al. Management of fertility preservation in prepubertal patients: 5 years' experience at the Catholic University of Louvain. *Hum Reprod* 2011;26:737-47. doi: 10.1093/humrep/deq387.
- Wyns C, Langendonck AV, Wese F-X, Donnez J, Curaba M. Long-term spermatogonial survival cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue. *Hum Reprod* 2008;23:2402-14. doi:10.1093/humrep/den272.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum Reprod* 2003;18:2660-67. doi:10.1093/humrep/deg483
- Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med* 1996;2:693-6. doi:10.1038/nm0696-693
- Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B, Langendonck AV, François-Xavier W, Donnez J. Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. *Hum Reprod* 2007;22:1603-11. doi: 10.1093/humrep/dem062
- Jezeq D, Schulze W, Kalanj-Bognar S, Vukelic Z, Milavec-Puretic V, Krhen I. Effects of various cryopreservation media and freezing thawing on the morphology of rat testicular biopsies. *Andrologia* 2001;33:368-78. doi: 10.1046/j.1439-0272.2001.00459.x
- Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod* 2005;20:1676-87. doi: 10.1093/humrep/deh797
- Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K, Hovatta O. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys under-going gonadotoxic cancer treatment. *Hum Reprod* 2007;22:1384-95. doi: 10.1093/humrep/del508
- Milazzo JP, Vaudreuil L, Cauliez B, et al. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Hum Reprod* 2008;23:17-28. doi: 10.1093/humrep/dem355
- Izadyar F, Matthijs-Rijnsbilt JJ, den Ouden K, Creemers LB, Woelders H, de Rooij DG. Development of a cryopreservation protocol for type a spermatogonia. *J Androl* 2002;23:537-45. doi: 10.1002/j.1939-4640.2002.tb02276.x
- Schlatt S, von Schonfeldt V, Schepers AG. Male germ cell transplantation: an experimental approach with a clinical perspective. *Br Med Bull* 2000;56:824-36. doi: 10.1258/0007142001903409

15. Brockbank KGM, Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot FG, Boggs JM, Taylor MJ. Storage of tissues by vitrification. *Transpl Proc* 2000;32:3-4. doi: 10.1016/S0041-1345(99)00851-9
16. Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A two-factor hypothesis of freezing injury evidence from Chinese hamster tissue culture cells. *Exp Cell Res* 1972;71:345-55. doi: 10.1016/0014-4827(72)90303-5
17. 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. doi: 10.1007/BF02788619
18. Delilbaşı L. In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni uygulamalar ve güncel yaklaşımlar). Ankara: Güneş Kitabevleri, 2008:61-83. ISBN: 9789752771697
19. Morris GJ, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation. *Cryobiology* 2013; 66:85-92. doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.11.007
20. Russell LD, Ettl RA, Hikim APS, Clegg ED, (editors). *Histopathological evaluation of the testis*. 1st Edition. Clearwater: Cache River Press, 1990:1-58.
21. Gouk S S, Loh YFJ, Kumar S D, Watson PF, Kuleshova LL. Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. *Fertil Steril* 2011; 95: 2399-2403. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.035.
22. Trump BF, Laiho KA, Mergner WJ, Arstila AU. Studies on the subcellular pathophysiology of acute lethal cell injury. *Beitr Path Bd* 1974;125:243-71. doi:10.1016/S0005-8165(74)80177-0
23. Baert Y, Goossens E, Saen D V, Ning L, Veld P, Tournaye H. Orthotopic grafting of cryopreserved prepubertal testicular tissue: in search of a simple yet effective cryopreservation protocol. *Fertil Steril* 2012; 97:1152-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.02.010.
24. Baert Y, Saen DV, Haentjens P, Veld PI, Tournaye H, Goossens E. What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking? *Hum Reprod* 2013;28:1816-26. doi: 10.1093/humrep/det100
25. Milazzo JP, Travers A, Bironneau AA, et al. Rapid screening of cryopreservation protocols for murine prepubertal testicular tissue by histology and PCNA immunostaining. *J Androl* 2010;31: 617-30. doi:10.2164/jandrol.109.009324.
26. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell Dev Biol* 1998;9:411-16. doi: 10.1006/scdb.1998.0203
27. Nugent D, Meirow D, Brook PF, Y, Gosden RG. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update* 1997;3:267-80. doi: 10.1093/humupd/3.3.267
28. Hossain A, Nagamani M. Erkek üreme hücrelerinin dondurularak saklanması (Çev: Kervancıoğlu G, Kervancıoğlu E). *İnfertilite ve Yardımla Üreme Teknikleri*. Ankara: Güneş Kitabevi, 2012:466-77. ISBN: 9789752773899
29. Crabbe E, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem A. 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;22:43-8. doi: 10.1046/j.1365-2605.1999.00149.x
30. Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat Rec* 2000;258:210-20. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(20000201)258:2<210::AID-AR10>3.0.CO;2-X
31. Robbins H, Doros C, Coyle K, Dobrinski I. Germ cells and testicular somatic cells have different sensitivity to cryopreservation. *Reprod Fertil Dev* 2012;25:184-184. doi: 10.1071/RDv25n1Ab74
32. Bloom W, Fawcett DW. *A Textbook of Histology*. 11th Edition. Philadelphia: Saunders Company, 1986:796-848. ISBN-10: 0721617298
33. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*. 6th edition. Philadelphia PA: Lippincott, Williams and Wilkins, 2011:784-818.
34. Travers A, Milazzo JP, Perdrix A, A, et al. Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. *Theriogenology* 2011;76:981-990. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.04.025
35. Unni S, Kasiviswanathan S, D'Souza S, S, et al. Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state and concentration of cryoprotectant. *Fertil Steril* 2011;97:200-8. doi: 10.1016/j.fertnstert. 2011.10.018