

IVF Uygulamalarında Kriyoprezervasyon

Dilek YAVUZ¹

GİRİŞ

Dokuların çok düşük sıcaklıkta uzun süreler boyunca canlılık yapısını kaybetmeden dondurularak saklanması ve gelecekte kullanılabilme imkânı tanıyan yöntemdir (ASRM2012). Bu durum normal insan fizyolojine aykırı olsa da zaman içerisinde çeşitli yöntemlerle mümkün kılındı. Daha önce imkânsız olan seçeneklerin yerini, dondurup çözme sayesinde embriyo ve gametlerin kullanımını kolaylaştırdı (1). IVF uygulamasıyla ilk doğumun 1978’de gerçekleşmesinden günümüze gelene kadar dünya genelinde yaklaşık 8 milyon bebeğin doğmasına yardımcı oldu. Dondurma ve çözme işlemleri sayesinde hastaya zaman kazandırmakta, artan embriyoları ileri bir zamanda kullanma şansını arttırmaktadır (2). Kriyoprezervasyondaki teknik gelişmeler, üremeye yardımcı tedavilerin gelişimiyle paralel bir şekilde ilerlemiştir. Kronolojik olarak gelişen kültür ortamı teknikleri, embriyonun ileri döneme kadar gelişmesini sağlayan takviyeler sayesinde mümkün olduğu kadar insan fizyolojini taklit etmeyi sağlamıştır (3). Dondurma işlemi sırasında hücre içi ve dışı arasındaki denge sağlanmalı, sıvı nitrojenle saklandıktan sonra çözme

durumundaki kriyoprotektanlar ortamdaki uzaklaştırılmalı, fizyolojik solüsyonlara aktarılmalı mümkün olduğu kadar hasar minimal oranda olmalı ve fonksiyonel özelliği ile yapısal durumu korunmalıdır.

Tarihçesi ve Gelişimi

1770’lerde dikkatini meniye yönlendiren, bilimsel alanda deneyler yapan rahip Lazaro Spallanzani, memelilerden ve bazı canlılardan aldığı meni örneğiyle spermatozoanın varlığını gösterdi, aygır spermının sıfır sıcaklık altındaki etkisini inceledi (4). 1938’de frengi için çare arayan Jahnel -79°C’ye kadar soğutulmuş olan sperm çözündükten sonra bir kısmının hareketliliğini tekrardan kazandığını gözlemleyince başarılı olabilecek dondurma yöntemleri arayışları yeniden başladı (5).

Parkes ve diğerleri, 1945’te soğuma hızının oranıyla çözülme işlemi gerçekleştikten sonra hayatta kalma oranının ilişkili olduğunu keşfettiler. Spermın dondurma sırasında büyük hacimli krioprotektan kullanımını dondurmaya yavaşlattığı için çözülme sonucunda motilite oranının arttığını bulmuşlardır (6).

¹ Uzm. Dr., Gazi Yaşargil Kadın Doğum ve Çocuk Hastanesi, Histoloji ve Embriyoloji Kliniği, balpetekdilek@gmail.com
ORCID iD: 0000-0002-2877-533X

Ovaryumu alınana hastada erken menopoz bulguları, tekrardan hastaya transferiyle kaybolabilmektedir (49).

Testis dokusu prezervasyonu fiziksel veya kimyasal toksisiteye maruz kalıldığı durumlarda, genetik yatkınlığın sebep olduğu germ hücre yokluğunda, tümör nedeniyle oluşacak, her yaşta grubunda ortaya çıkabilen erkek fertilizasyonunukorumak için Spermin dondurulması tercih nedeni olsa da bu yaklaşım prepubertal erkek çocuklara yardımcı olamaz. Eğer bu erkek çocuklar ergenliğin başlangıcında sperm üretmeye başlamışlarsa, testis dokusu kriyoprezervasyonu yoluyla fertilizasyon için spermatogonial kök hücreleri kullanılabilir. Deneysel bir aşamada olsa da ergen hasta erişkin çağa geldiğinde infertilite durumunda hastaya nakli yapılabilir ama ovaryum nakli gibi tümör açısından tekrardan oluşma riski göz önünde bulundurulmalıdır. Testis dokusunun dondurulup çözülmesinden sonra dokuya nakledilmesi, dokudan elde edilen spermatogonyal kök hücrelerin seminifer tübüllere implante edilmesi ya da olgun hücrelerin spermatogonyal kök hücrelerden ROSİ (Round Spermatid Enjeksiyonu) yöntemiyle IVF te kullanılması gibi farklı yöntemler düşünülebilir. Aynı cakiyoprezervasyon protokollerinin etkinliği şimdiye kadar transplantasyon deneyleri ile değerlendirilebilir olsa da insan testis dokusu ve testiküler hücre süspanسیونları için deneysel aşamadır. Bu nedenle, donmadan sonra insan spermatogonyal kök hücrelerin işlevselliğini protokollerden hangisi ile doğru yolun bulunacağı sonucuna varmak zordur (50).

SONUÇ

Sonuç olarak üreme tıbbı alanında kullanılan dondurma (kriyoprezervasyon) yöntemlerini ve bu yöntemlerin geçmişini açıklamaktadır. Doku, hücre veya organizmaların düşük sıcaklıkta dondurularak saklanması ve gelecekte kullanılabilmesine olanak tanıyan bir yöntemdir. Bu metinde, embriyo, gamet (yumurta ve sperm) ve sperm

kriyoprezervasyonu yöntemleri hakkında bilgi verilmektedir. Ayrıca dondurma işlemi sırasında kullanılan kriyoprotektanlar (koruyucu maddeler), dondurma ve çözme yöntemleri, embriyo ve oosit kriyoprezervasyonu, sperm kriyoprezervasyonu gibi konular ele alınmaktadır. Yavaş dondurma ve vitrifikasyon gibi farklı dondurma yöntemleri açıklanmış ve bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları hakkında bilgi verilmiştir. Ayrıca, bu yöntemlerin nasıl uygulandığı ve hangi durumlarda tercih edilebileceği gibi konular da ele alınmıştır.

Çalışmada üreme tıbbının gelişimini ve bu alandaki tekniklerin nasıl zaman içinde evrildiğini açıklayarak, bu alanda yaşanan tarihsel gelişmeleri de özetlenmektedir.

KAYNAKLAR

1. V.A. Kushnir, D.H. Barad, D.F. Albertini, S.K. Darmon, N. Gleicher, Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004-2013. *Reprod Biol Endocrinol*, 15 (2017), p. 6
2. Kenny A. R.-W., Max W. Amandine A. Iceage: Cryopreservation in assisted reproduction. Volume 19, Issue 2, June 2019, Pages 119-126
3. Chronopoulou E, Harper JC. IVF culture media: past, present and future. *Hum Reprod Update* 2014 Jan-Feb; 21(1):39-55.
4. J. Hammond. (1930) The Effect of Temperature on the Survival in vitro of Rabbit Spermatozoa Obtained From the Vagina. *J Exp Biol* (1930) 7 (2): 175-195.
5. Jahnel F. About the regaining of activity of human spermatozoa exposed to very low temperature. *Klin Wochenschr* 1938; 17:1273.
6. Parkes AS. Preservation of human spermatozoa at low temperatures. *Br Med J* 1945; 2: 212.
7. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949 Oct 15; 164(4172):666.
8. Chang MC. Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. *Nature* 1947 May 3; 159(4044):602.
9. Chang MC. Development of parthenogenetic rabbit blastocysts induced by low temperature storage of unfertilized ova. *Exp Zool* 1954; 125:127.
10. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196° and -269°C. *Science* 1972 Oct 27; 178(4059):411-4.
11. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci* 1972 Nov 22; 11(22):1071-9.

12. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985 Feb 14-20; 313(6003):573-5.
13. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986 Apr 19; 1(8486):884-6.
14. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999 Dec; 14(12):3077-9.
15. Gardner, D.K. (Ed.). (2007). *In Vitro Fertilization: A Practical Approach*.
16. Delilbaşı L. Adan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. İstanbul, Veri Medikal Yayıncılık, 2008; 229-258.
17. Whittingham DG. Principles of embryo preservation. In: Ashwood-Smith MJ, Farrant J, editors. *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. Tunbridge Wells: Pitman Medical; 1980. p. 65-83.
18. Elliott, GD et al. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. 2017; 76: 74-91.
19. Raju, R et al. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2021; 1865: 129749.
20. W.F. Rall, G.M. Fahy. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification *Nature*, 313 (1985), pp. 573-575
21. P.W. Shaw, A.G. Bernard, B.J. Fuller, J.H. Hunter, R.W. Shaw. Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure times on survival. *Mol Reprod Dev*, 33 (1992), pp. 210-214
22. P. Quinn, J.F. Kerin. Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 3 (1986), pp. 40-45
23. R.S. Tedder, M.A. Zuckerman, A.H. Goldstone, A.E. Hawkins, A. Fielding, E.M. Briggs, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*, 346 (1995), pp. 137-140
24. Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2012 Sep-Oct; 18(5):536-54.
25. Kuc P, Kuczynska A, Stankiewicz B, Sieczynski P, Matysiak J, Kuczynski W. Vitrification vs. slow cooling protocol using embryos cryopreserved in the 5th or 6th day after oocyte retrieval and IVF outcomes. *Folia Histochem Cytobiol* 2010 Jan 1; 48(1):84-8.
26. Wang XL, Zhang X, Qin YQ, Hao DY, Shi HR. Outcomes of day 3 embryo transfer with vitrification using Cryoleaf: a 3-year follow-up study. *J Assist Reprod Genet* 2012 Sep; 29(9):883-9.
27. J. Donnez, M.M. Dolmans. Fertility preservation in women. *N Engl J Med*, 377 (2017), pp. 1657-1665
28. M. Roque, M. Valle, A. Kostolias, M. Sampaio, S. Geber. Freeze-all cycle in reproductive medicine: current perspectives. *JBRA Assist Reprod*, 21 (2017), pp. 49-53
29. D. Glujovsky, C. Farquhar, A.M. Quinteiro Retamar, et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology *Cochrane Database Syst Rev* (2016)
30. V.A. Moragianni, J.D. Cohen, S.E. Smith, J.S. Schinfeld, S.G. Somkuti, A. Lee, et al. Outcomes of day-1, day-3, and blastocyst cryopreserved embryo transfers *Fertil Steril*, 93 (2010), pp. 1353-1355.
31. S. Fernandez-Shaw, R. Cercas, C. Brana, C. Villas, I. Pons. Ongoing and cumulative pregnancy rate after cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer using vitrification for cryopreservation: impact of age on the results *J Assist Reprod Genet*, 32 (2015), pp. 177-184
32. Montag, M., van der Ven, K., Dorn, C., and van der Ven, H. (2006). Extended embryo culture reduces the implantation rate on day 4 and day 5 when only a maximum of three embryos are cultured beyond the pronuclear stage. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 124, 65-69.
33. S. Makieva, C. Stähli, M. Xie, A. V. Gil, M. K. Sachs, B. Leeners. The impact of zygote vitrification timing on pregnancy rate in frozen-thawed IVF/ICSI cycles. *Front. Cell Dev. Biol.*, 13 Jan. 2023. |
34. Rienzi L, Ubaldi FM. Oocyte versus embryo cryopreservation for fertility preservation in cancer patients: guaranteeing a woman's autonomy. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32(8): 1195- 1196.
35. Martinez F; International Society for Fertility Preservation E-AEWG. Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives. *Fertil Steril*. 2017; 108(3): 407- 15 e11.
36. Polyzos NP, Drakopoulos P, Parra J, et al. Cumulative live birth rates according to the number of oocytes retrieved after the first ovarian stimulation for in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a multicenter multinational analysis including approximately 15,000 women. *Fertil Steril*. 2018; 110(4): 661- 70 e1.
37. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, La Barbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, Vanderpoel S, Racowsky C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017 Mar 1; 23(2):139-155.
38. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*. 2007; 67(1): 73- 80.
39. Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod*. 1987; 2(8): 695- 700.
40. Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril*. 2001; 75(4): 769- 777.
41. Forman EJ, Li X, Ferry KM, Scott K, Treff NR, Scott RT Jr. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic

- sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertil Steril*. 2012; 98(3): 644- 649.
42. A.J.F. Eva Mocé, James K. Graham. HUMAN SPERM CRYOPRESERVATION. *EMJ European Medical Journal*, 1 (2016), pp. 86-91
 43. H. Mossad, M. Morshedi, J.P. Toner, S. Oehninger. Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men: implications for artificial insemination. *Arch Androl*, 33 (1994), pp. 51-57
 44. J. Aizpurua, L. Medrano, M. Enciso, J. Sarasa, A. Romero, M.A. Fernandez, et al. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Hum Reprod*, 32 (2017), pp. 2007-2015
 45. Wolk B, Leitel E, Rasch CM, Mesbah-Karimi N, Harris SB, Fahy GM. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*. 2000; 40: 288-36
 46. A.Z. Szell, R.C. Bierbaum, W.B. Hazelrigg, R.J. Chetkowski. Live births from frozen human semen stored for 40 years. *J Assist Reprod Genet*, 30 (2013), pp. 743-744
 47. S. Ohlander, J. Hotaling, E. Kirshenbaum, C. Niederberger, M.L. Eisenberg. Impact of fresh versus cryopreserved testicular sperm upon intracytoplasmic sperm injection pregnancy outcomes in men with azoospermia due to spermatogenic dysfunction: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 101 (2014), pp. 344-349
 48. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. *Hum Reprod Update*. 2001 Nov-Dec; 7(6):526-34.
 49. Kristensen SG, Andersen CY. Cryopreservation of Ovarian Tissue: Opportunities Beyond Fertility Preservation and a Positive View Into the Future. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Jun 28; 9:347.
 50. Onofre J, Baert Y, Faes K, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Hum Reprod Update*. 2016 Nov; 22(6):744-761.