



T.C.

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI VİTRİFİKASYON YÖNTEMLERİ İLE  
DONDURULAN SIĞIR OOSİTLERİNİN ÇÖZDÜRME SONRASI  
İN VİTRO MATURASYON BAŞARILARI**

**Veteriner Hekim Şöhret GÜLER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Afşin KÖKER**

**BURDUR-2018**

T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI VİTRİFİKASYON YÖNTEMLERİ İLE  
DONDURULAN SIĞIR OOSİTLERİNİN ÇÖZDÜRME SONRASI  
İN VİTRO MATURASYON BAŞARILARI**

**Şöhret GÜLER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Afşin KÖKER**

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0247-YL-14 proje numarası ile desteklenmiştir.

**BURDUR-2018**

**KABUL ve ONAY**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

*Şöhret GÜLER* tarafından *Dr. Öğr. Üyesi Afşin KÖKER* yönetiminde hazırlanan *farklı vitrifikasyon yöntemleri ile dondurulan sığır oositlerinin çözündürme sonrası in vitro maturasyon başarıları* başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

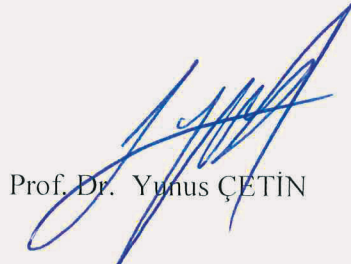
28/11/2018



Prof. Dr. Tevfik TEKELİ

Selçuk Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi

**Başkan**



Prof. Dr. Yunus ÇETİN

Mehmet Akif Ersoy  
Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi

**Jüri**



Dr. Öğr. Üyesi Afşin  
KÖKER

Mehmet Akif Ersoy  
Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi

**Jüri**

**ONAY**

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu **07.12.2018** Tarih ve **40**.. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



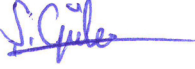
Prof. Dr. Mustafa Doğa TEMİZSOYLU  
Müdür  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

## TEŞEKKÜR

‘Farklı vitrifikasyon yöntemleri ile dondurulan sığır oositlerinin çözdürme sonrası in vitro maturasyon başarıları’ başlıklı tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yunus ÇETİN, Doç. Dr. Reha Ali AĞAOĞLU ve diğer Öğretim Üyesi hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda bütün içtenliği ile yardımlarını esirgemeyen Zootekni Anabilim Dalı Doç. Dr. Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU hocama ve Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Cevat SİPAHİ hocama teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda her daim yanımda olan kız kardeşim Ziraat Yüksek Mühendisi Sevda GÜLER başta olmak üzere babam Süleyman GÜLER’e, annem Ümran GÜLER’e, erkek kardeşim Osman GÜLER’e ve meslektaşım Veteriner Hekim Evren PEKŞEN’e şükranlarımı sunarım.

## ETİK BEYAN

*Farklı vitrifikasyon yöntemleri ile dondurulan sığır oositlerinin çözdürme sonrası in vitro maturasyon başarıları* başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi Afşin KÖKER danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim.



Şöhret GÜLER

28.11.2018



ONAY

Dr. Öğr. Üyesi Afşin KÖKER

Danışman

## İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kriyoprezervasyonun Tarihi Gelişimi	1
1.2. Kriyoprezervasyonun Önemi	6
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Kriyoprezervasyonda Kullanılan Malzemeler	8
2.1.1. Laboratuvar Cihazları ve Demirbaş Nitelikli Materyal	8
2.1.2. Sarf ve Diğer Malzemeler	10
2.1.3. Kriyoprotektan Özellikteki Maddeler	19
2.1.4. Medyum Katkı Maddeleri	25
2.2. Sığır Oositlerinin Kriyobiyolojik Özellikleri	27
2.2.1. Soğuğa Karşı Hücrel Duyarlılık	28
2.2.2. Dondurma ve Çözdürme Aşamalarında Karşılaşılan Hücrel Hasarlar	30
2.3. İn Vitro Oosit Toplama Yöntemleri	33
2.3.1. Aspirasyon Yöntemi	33
2.3.2. Folikül Diseksiyon Yöntemi	34
2.3.3. Ovaryum Dilimleme Yöntemi	34
2.4. Kriyoprezervasyon İçin Uygun Oositlerin Seçilmesi	35
2.5. Oositlerin Kriyoprezervasyon Yöntemleri	36
2.5.1. Yavaş Dondurma Yöntemleri	36
2.5.2. Hızlı Dondurma Yöntemleri	42
2.5.3. Vitrifikasyon	43
2.5.4. Yavaş dondurma ve Vitrifikasyon Sonrasında Oositlerin Kurutulması	57
2.6. Günümüz İtibari ile Kriyobiyolojik Uygulamalarda Vitrifikasyon Yöntemleri	59

2.6.1. Açık Uçlu Modifiye Payet (OPS, Open Pulled Straws ) Yöntemi	59
2.6.2. Kapalı Uçlu Modifiye Payet (CPS, Close Pulled Straws ) Yöntemi	60
2.6.3. Katı Yüzey Vitrifikasyonu (SSV, Solid Surface Vitrification ) Yöntemi	61
2.6.4. Minimum Damla Hacmi (MDS, Minimum Drop Size ) Yöntemi	62
2.6.5. Kriyotop (CT, Cryotop) Yöntemi	63
2.6.6. Kriyoloop (CL, Cryoloop) Yöntemi	63
2.6.7. Sarah Vitrifikasyon Yöntemi	65
2.7. İn Vitro Oosit Maturasyonu	66
2.7.1. Oositlerde Maturasyon Kriterleri	77
3. GEREÇ ve YÖNTEM	81
3.1. Ovaryumların Toplanması ve Laboratuvara Taşınması	81
3.2. Foliküllerin Aspirasyonu ve Oositlerin Seleksiyonu	82
3.3. Deney Düzenegi	85
3.3.1. Medyumların Hazırlanması	86
3.3.2. Oositlerin Vitrifikasyonu	88
3.3.3. Oositlerin Çözdürülmesi	92
3.3.4. İn Vitro Maturasyon	95
3.3.5. Maturasyon Kriterlerinin Değerlendirilmesi	96
3.4. İstatistiksel Analiz	97
4. BULGULAR	98
4.1. Vitrifikasyon ve Çözdürme Sonrası Elde Edilen Bulgular	99
4.2. Maturasyon Sonrası Elde Edilen Bulgular	99
5.TARTIŞMA	105
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	114
KAYNAKLAR	116
EKLER	144
ÖZGEÇMİŞ	152

## ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** Vitrifikasyon yüzey taşıyıcı sistemleri. (1) Elektron mikroskopik ızgara, (2) minimum damla hacmi, (3) kriyotop, (4) kriyoloop, (5) yarım payet, (6) kriyoleaf, (7) fibre plug, (8) direct cover vitrification, (9) vitrifikasyon spatulası, (10) naylon mesh, (11) plastic blade, (12) vitri-inga. **14**
- Şekil 2.2.** Vitrifikasyon tüplü taşıyıcı sistemleri. (1, a) Plastik payet, (1, b) açık uçlu modifiye payet, (1, c) superfine OPS, (1, d) flexipet-denuding pipet, (2) kriyotip, (3) yüksek- güvenilir vitrifikasyon, (4) pipet ucu, (5) mühürlenmiş modifiye payet, (6) kriyopette, (7) rapid-i ve (8) JY payet. **15**
- Şekil 2.3.** Sarah cihazının iki resmi. A) LCD ekranlı kapalı cihaz, B) Payet ile birlikte robotik kolu, solüsyonları ve sıvı azot konteyneri ile birlikte dönen metal plağı gösteren açık cihaz. **18**
- Şekil 2.4.** Farklı kalitelere sahip immatür sığır KOK'ların görünümü. A-KOK, açık ve kompakt bir kumulus ve saydam ooplazma varlığı sergiler; B-KOK, koyu ve kompakt kumulus ve koyu ooplazma sergiler ve C-KOK, koyu ve yayılmış kumulus ve koyu ooplazma sergiler. **35**
- Şekil 2.5.** İntraselüler buz oluşumu üzerine soğutma oranının etkisi. **38**
- Şekil 2.6.** Vitriyifiye ve liyofilize edilmiş oositler. Vitrifikasyon ve kurutulduktan sonra kriyotop taşıyıcısındaki kuru oositler ve sağ tarafta rehidrasyon sonrası canlı/ölü floresan boyası ile boyanan oositler. **58**
- Şekil 2.7.** Açık uçlu modifiye payet (OPS) yöntemi. (a) Oositlerin veya embriyoların, OPS payetine yüklenmesi, (b) OPS payetinin sıvı azot içine daldırılması, (c) OPS payetinin çözündürülmesi. **59**
- Şekil 2.8.** Kapalı uçlu modifiye payet (CPS) yöntemi. (a) Oositlerin CPS payetine yüklenmesi, (b) CPS payetinin sıvı azot içine daldırılması, (c) CPS payetinin çözündürülmesi. **61**
- Şekil 2.9.** Katı yüzey vitrifikasyonu (SSV) yöntemi. **62**



<b>Şekil 2.10.</b>	Kriyotop (CT) yöntemi.	<b>63</b>
<b>Şekil 2.11.</b>	Kriyoloop (CL) yöntemi. (A) Bir ilmek içinde tutulan sekiz-hücreli sığır embriyolarını göstermektedir. (B) İlmek doğrudan sıvı azot içine daldırılır ve ilmek sıvı azotun altındayken kapağı kapatılır. (C) Vitrifikasyon ve çözdürme sonrası normal olarak gelişen hamster embriyolarını göstermektedir.	<b>64</b>
<b>Şekil 2.12.</b>	Sarah vitrifikasyon yönteminde kullanılan 0.25 ml'lik bir payetin ucuna tutturulmuş özel kapsül.	<b>66</b>
<b>Şekil 2.13.</b>	Üç farklı derecede kumulus ekspansiyonu gösteren sığır kumulus oosit kompleksleri, (a) 0 Derece: Taze toplanmış kumulus oosit komplekslerine kıyasla morfolojik bir değişiklik gözlenmeyen; (b) 1 Derece: Kumulus ooforusu biraz genişleyen fakat hala hücrelerin birbiriyle bağlanması nispeten sıkı olan ve kümelenmiş hücreler gözlenen (c) 2 Derece: Kumulus ooforusu genişlemiş ve kumulus hücreleri homojen olarak yayılmıştır.	<b>78</b>
<b>Şekil 2.14.</b>	M II aşamasındaki sığır oositinin şematığı.	<b>78</b>
<b>Şekil 2.15.</b>	Sığır oositlerinin nükleer maturasyonun aşamaları.	<b>80</b>
<b>Şekil 3.1.</b>	Hazırlanan taşıma medyumunun termos içine aktarılması (a) ve termos içinde bekletilen ovaryumlar (b).	<b>81</b>
<b>Şekil 3.2.</b>	Serviyet üzerine sıralanan ovaryumlar (a), aspirasyon işleminde iğnenin pozisyonu (b) ve ovaryumlardaki foliküllerin aspirasyon işlemi (c).	<b>82</b>
<b>Şekil 3.3.</b>	Aspirasyon sonrasında tüpün manipülasyon medyumunu ile tamamlanması (a), yıkama işlemindeki süpernatantın enjektör ile çekilerek uzaklaştırılması (b), oositlerin yıkama öncesi (sağ taraftaki) ve yıkama sonrasındaki (sol taraftaki) tüpteki görünüşleri (c).	<b>83</b>
<b>Şekil 3.4.</b>	90 ml'lik petri içindeki oositlerin aranması (sol) ve tabanı dış taraftan 1 cm aralıkla çizilmiş 60 ml'lik petri içindeki oositlerin sayımı (sağ).	<b>84</b>
<b>Şekil 3.5.</b>	Oositlerin sınıflandırılması.	<b>85</b>
<b>Şekil 3.6.</b>	Çalışma deney düzeneğinin şematığı.	<b>86</b>

<b>Şekil 3.7.</b>	Maturasyon damlası oluşturma. Maturasyon medyumundan 30 $\mu$ 'lik damla oluşturma (a), 30 $\mu$ 'lik oluşturulan damlanın mineral yağ ile kaplanması (b), mineral yağ ile kaplanan 30 $\mu$ 'lik damlanın içine 70 $\mu$ 'lik maturasyon medyumunun eklenmesi (c).	<b>88</b>
<b>Şekil 3.8.</b>	İnsülin enjektörü yardımıyla OPS payetine oositlerin çekilmesi.	<b>89</b>
<b>Şekil 3.9.</b>	OPS vitrifikasyon yönteminin şematığı.	<b>90</b>
<b>Şekil 3.10.</b>	SSV vitrifikasyon yönteminin şematığı.	<b>92</b>
<b>Şekil 3.11.</b>	OPS vitrifikasyon yönteminde çözdüme şematığı.	<b>93</b>
<b>Şekil 3.12.</b>	SÇS 1 damlasına aktarılmış SSV damlacığı (a), SÇS 1 damlasında karıştırılarak çözünen SSV damlacığı (b) ve SÇS 1 damlasında çözünen oositlerin modifiye pastör pipetiyle alınması (c).	<b>94</b>
<b>Şekil 3.13.</b>	SSV yönteminin çözdüme şematığı.	<b>95</b>
<b>Şekil 3.14.</b>	Oositlerin maturasyon medyumunda yıkanması (a) ve yıkanan oositlerin IVM damlasına aktarılması (b).	<b>96</b>
<b>Şekil 4.1.</b>	Üç farklı derecedeki kumulus ekspansiyonunun değerlendirilmesi. (a) 0 derece: İmmatür oositlere kıyasla morfolojik bir değişim gözlenmedi, (b) 1 derece: Kumulus hücreleri genişledi fakat hücreler arasındaki bağ hala göreceli olarak sıkıydı, (c) 2 derece: Kumulus hücreleri daha çok genişleyerek homojen şekilde yayıldı.	<b>101</b>
<b>Şekil 4.2.</b>	Gruplardaki kumulus ekspansiyonu dağılım grafiğı.	<b>101</b>
<b>Şekil 4.3.</b>	Perivitellin boşluğu normal şekilde oluşmuş ve bu boşluğa polar body atan matür oosit (a), perivitellin boşluğu çok genişlemiş oosit (b), ooplazması elips şeklinde olan oosit (c), heterojen ooplazma görünümlü oosit (d).	<b>102</b>
<b>Şekil 4.4.</b>	Gruplardaki polar body ve dejenerasyon oranlarının grafiğı.	<b>103</b>
<b>Şekil 4.5.</b>	Maturasyon öncesi immatür oositlerin görünümü (a), maturasyon sonrası kumulus ekspansiyon görünümü (b), kumulus hücreleri soyulan ve perivitellin boşluğa polar body atan oositlerin görünümü (c).	<b>104</b>

## TABLULAR

<b>Tablo 1.1.</b>	Memeli oositlerin başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu sonrasında meydana gelen ilk doğumlar.	<b>5</b>
<b>Tablo 1.2.</b>	Donmuş embriyodan doğan yavruların tarihsel gelişimi.	<b>5</b>
<b>Tablo 2.1.</b>	Yüzey Sistem Vitrifikasyon Gereçleri.	<b>12</b>
<b>Tablo 2.2.</b>	Tüplü Sistem Vitrifikasyon Gereçleri.	<b>13</b>
<b>Tablo 2.3.</b>	Vitrifikasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları.	<b>16</b>
<b>Tablo 2.4.</b>	Kriyoprotektanların avantajları ve dezavantajları.	<b>22</b>
<b>Tablo 2.5.</b>	Farklı aşamalarındaki oositlerin dondurulmaya karşı özellikleri.	<b>27</b>
<b>Tablo 2.6.</b>	Hücrelerin karşılaştığı stres oluşturucu durumlar ve hücrenin verdiği potansiyel yanıtlar.	<b>31</b>
<b>Tablo 2.7.</b>	Biyolojik sistemlerde hücre hasarına ve ölüme neden olan soğutma ve kriyoprezervasyonla ilişkili faktörler.	<b>32</b>
<b>Tablo 2.8.</b>	Memeli oositlerin başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu sonrasında meydana gelen ilk doğumlar.	<b>42</b>
<b>Tablo 4.1.</b>	Çalışmada kullanılan inek, ovaryum, folikül ve folikülaspirasyon sayıları.	<b>98</b>
<b>Tablo 4.2.</b>	Çalışmada kullanılan oosit sayıları.	<b>98</b>
<b>Tablo 4.3.</b>	Maturasyon sonrası gruplardaki kumulatif ekspansiyon bulguları. Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli derecede farklıdır ( $p<0.001$ ).	<b>100</b>
<b>Tablo 4.4.</b>	Maturasyon sonrası gruplardaki polar body bulguları. Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli derecede farklıdır ( $p<0.001$ ).	<b>102</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

-	Eksi	
%	Yüzde	
+	Artı	
<	Küçüktür	
>	Büyüktür	
±	Standart sapma	
°C	Santrigrad derece	
μ	Viskozite	
μl	Mikrolitre	
μm	Mikrometre	
μs	Mikrosaniye	
<b>AFGP</b>	Antifriz Glikoprotein	Antifreeze Glycoprotein
<b>AFP</b>	Antifriz Protein	Antifreeze Protein
<b>ark</b>	Arkadaşları	
<b>ART</b>	Yardımcı Üreme Teknolojileri	Assisted Reproductive Technologies
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat	
<b>BMP15</b>	Kemik Morfogenetik Protein 15	Bone Morphogenetic Protein 15
<b>BMPR2</b>	Kemik Morfogenetik Protein Reseptörü II	Bone Morphogenetic Protein Receptor II
<b>BSA</b>	Sığır Serum Albümin	Bovine Serum Albumin
<b>BVD</b>	Sığır Viral Diyare	Bovine Virus Diarrhea
<b>C</b>	Karbon	
<b>cAMP</b>	Siklik Adenozin Monofosfat	Cyclic Adenosine Monophosphate
<b>CB</b>	Sitokalazin B	Cytochalasin B
<b>CL</b>	Kriyoloop	Cryoloop
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit	
<b>CPS</b>	Kapalı Uçlu Modifiye Payet	Close Pulled Straw
<b>CR</b>	Soğutma Hızı	Cooling Rate
<b>CS</b>	Buzağı Serumu	Calf Serum

<b>CT</b>	Kriyotop	Cryotop
<b>dk</b>	Dakika	
<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit	Dimethyl Sulphoxide
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit	
<b>DPBS</b>	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
<b>E2</b>	Östradiol- 17 $\beta$	Estradiol-17 $\beta$
<b>EG</b>	Etilen Glikol	Ethylene Glycol
<b>eIFs</b>	Ökaryotik Başlatma Faktörleri	Eukaryotic İnitiation Factors
<b>EME</b>	Etilen Glikol Monometil Eter	Ethylene Glycol Monomethyl Ether
<b>FBS</b>	Fetal Sığır Serumu	Fetal Bovine Serum
<b>FCS</b>	Fetal Buzağı Serumu	Fetal Calf Serum
<b>FS</b>	Fizyolojik Serum	
<b>FSH</b>	Folikül Uyarıcı Hormon	Follicle Stimulating Hormone
<b>G</b>	Gauge	
<b>GDF9</b>	Büyüme Farklılaşma Faktörü 9	Growth Differentiation Factor 9
<b>GV</b>	Germinal Vezikül	Germinal Vesicle
<b>GVBD</b>	Germinal Vezikül Yıkımı	Germinal Vesicle Break Down
<b>hCG</b>	İnsan Koryonik Gonadotropini	Human Chorionic Gonadotropin
<b>HS</b>	Yarım Payet	Hemi Straw
<b>ICSI</b>	İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu	Intra Cytoplasmic Sperm Injection
<b>IVC</b>	İn Vitro Kültürü	In Vitro Culture
<b>IVEP</b>	İn Vitro Embriyo Üretimi	In Vitro Embryo Produced
<b>IVF</b>	İn Vitro Fertilizasyon	In Vitro Fertilization
<b>IVM</b>	İn Vitro Maturasyon	In Vitro Maturation
<b>IVP</b>	İn Vitro Üretimi	In Vitro Produced
<b>KOK</b>	Kumulus Oosit Kompleksi	
<b>KP</b>	Kriyoprotektan	
<b>l</b>	Litre	
<b>LH</b>	Luteinize Edici Hormon	Luteinizing Hormone
<b>LN<sub>2</sub></b>	Sıvı Azot	Liquid Nitrogen

<b>M</b>	Molar		
<b>MDS</b>	Minimum Damla Hacmi		Minimum Drop Size
<b>mg</b>	Miligram		
<b>M I</b>	Metafaz I		
<b>M II</b>	Metafaz II		
<b>ml</b>	Mililitre		
<b>mm</b>	Milimetre		
<b>mmHg</b>	Milimetre Civa		
<b>MPF</b>	Maturasyon	Destekleyici	Maturation Promoting Factor
	Faktör		
<b>mRNA</b>	Mesajcı Ribonükleik asit		
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür		
<b>Na-piruvat</b>	Sodyum Piruvat		
<b>NCAM</b>	Yüzey Adezyon Proteinleri		Surface Adhesion Proteins
<b>ng</b>	Nanogram		
<b>nl</b>	Nanolitre		
<b>OÇS 1</b>	OPS Çözdürme Solüsyonu 1		
<b>OÇS 2</b>	OPS Çözdürme Solüsyonu 2		
<b>OH</b>	Hidroksit		
<b>OMI</b>	Oosit Maturasyon İnhibitörleri		Oocyte Maturations Inhibitors
<b>OPS</b>	Açık Uçlu Modifiye Payet		Open Pulled Straw
<b>OPU</b>	Ultrason Rehberliğinde Oosit Toplanması		Ovum Pick-Up
<b>OSF</b>	Oosit Salgılayan Faktörler		Oocyte Secreted Factors
<b>OVS 1</b>	OPS Vitrifikasyon solüsyonu 1		
<b>OVS 2</b>	OPS Vitrifikasyon solüsyonu 2		
<b>P4</b>	Progesteron		
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponlu Solüsyonu	Tuz	Phosphate Buffered Saline
<b>pH</b>	Potansiyel Hidrojen		
<b>PN</b>	Pronükleus		Pronucleus
<b>PROH</b>	Propilen Glikol		Propylene Glycol

<b>PVA</b>	Polivinil Alkol	Polyvinyl Alcohol
<b>PVP</b>	Polivinil Piroolidon	Polyvinyl Pyrrolidone
<b>qRT-PCR</b>	Kantitatif Real-Time Polimeraz Zinciri	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit	
<b>SÇS 1</b>	SSV Çözdürme Solüsyonu 1	
<b>SÇS 2</b>	SSV Çözdürme Solüsyonu 2	
<b>sn</b>	Saniye	
<b>SPOM</b>	Simüle Edilmiş Fizyolojik Oosit Maturasyon	Simulated Physiological Oocyte Maturation
<b>SSEA-1</b>	Yüzey Embriyonik Proteinleri	Surface Embryonic Proteins
<b>SSV</b>	Katı Yüzey Vitrifikasyon	Solid Surface Vitrification
<b>SVS 1</b>	SSV Vitrifikasyon Solüsyonu 1	
<b>SVS 2</b>	SSV Vitrifikasyon Solüsyonu 2	
<b>TCM199</b>	Doku Kültürü Medyumu	Tissue Culture Medium
<b>Tg</b>	Cam Haline Geçiş Sıcaklığı	Glass Transition Temperature
<b>TGF-β1</b>	Transforme Edici Büyüme Faktörü- β 1	Transforming Growth Factor Beta 1
<b>THP</b>	Termal Histerezis Proteinleri	Thermal Hysteresis Proteins
<b>v</b>	Hacim	
<b>VS</b>	Vitrifikasyon Solüsyonu	Vitrification Solution
<b>WR</b>	Isınma Hızı	Warming Rate
<b>ZP</b>	Zona pellusida	Zona Pellucida

**T.C.**  
**BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Yüksek Lisans Tezi

Farklı Vitrifikasyon Yöntemleri ile Dondurulan Sığır Oositlerinin Çözdürme Sonrası  
In Vitro Maturasyon Başarıları

Şöhret GÜLER

Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Afşin KÖKER

BURDUR – 2018

**ÖZET**

Bu çalışmanın amacı; immatür sığır oositlerinin OPS ve SSV vitrifikasyon yöntemleriyle dondurulması ve bu yöntemlerin maturasyon üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Mezbahada kesilen hayvanların ovaryumlarından toplanan oositler stereomikroskop altında incelendi ve etrafı en az 3 kat sıkı kumulus hücreleriyle çevrili 450 oosit kullanıldı. Vitrifikasyon yöntemine göre OPS, SSV ve kontrol grubu olarak 3 grup oluşturuldu. OPS grubundaki oositler; %20 CS, %10 EG ve %10 DMSO içeren TCM199 medyumunda 30-45 sn bekletildi ve %20 CS, %20 EG, %20 DMSO ve 0.5M sükröz içeren TCM199 medyumunda 20 sn bekletilerek OPS yöntemiyle vitrifiye edildi. SSV grubundaki oositler; %20 CS ve %4 EG içeren TCM199 medyumunda 12-15 dk bekletildi ve %20 CS, %35 EG, %5 PVP ve 0.4 M trehaloz içeren TCM199 medyumunda 25-30 sn bekletilerek SSV yöntemiyle vitrifiye edildi. Vitrifiye edilen oositler, sıvı azot içerisinde en az 1 ay saklandıktan sonra çözdürülerek IVM'a alındı. Kontrol grubundaki oositler, vitrifiye edilmeksizin IVM'a alındı. IVM işlemi, %10 FCS, 5 µg/ml LH, 0.5 µg/ml FSH, 27.5 µg/ml Napiruvat ve antibiyotik içeren TCM199 medyumunu kullanılarak, 38.5°C'deki %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saatte yapıldı. Maturasyon sonrasında kumulus ekspansiyonu incelendiğinde, OPS grubunda 146 oositten 118'inde (%80.82) 2 derecede, 22'sinde (%15.07) 1 derecede ve 6'sında (%4.11) 0 derecede kumulus ekspansiyonu gözlemlendi. SSV grubunda 144 oositten 113'ünde (%78.47) 2 derecede, 20'sinde (%13.89) 1 derecede ve 11'inde (%7.64) ise 0 derecede kumulus ekspansiyonu gözlemlendi. Kontrol grubunda 150 oositten 144'ünde (%96.00) 2 derecede, 4'ünde (%2.67) 1 derecede ve 2'sinde (%1.33) ise 0 derecede kumulus ekspansiyonu gözlemlendi. Soyulan oositlerde



polar body incelendiğinde, OPS grubunda 138 oositten 32'sinde (%23.19) polar body bulunduğu, 96'sında (%69.56) polar body bulunmadığı ve 10 oositin (%7.25) ise dejenere olduğu belirlendi. SSV grubunda 134 oositten 28'inde (%20.90) polar body bulunduğu, 95'inde (%70.90) polar body bulunmadığı ve 11 oositin (%8.20) ise dejenere olduğu belirlendi. Kontrol grubunda 137 oositten 108'inde (%78.83) polar body bulunduğu, 25'inde (%18.25) polar body bulunmadığı ve 4 oositin (%2.92) ise dejenere olduğu belirlendi. OPS ve SSV grupları arasında önemli derecede bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). Vitrifikasyon grupları, kontrol grubuna kıyasla önemli derecede düşük bulundu ( $p<0.001$ ). Çalışmanın sonucunda, immatür sığır oositlerinin OPS ve SSV vitrifikasyon yöntemleriyle vitrifiye edilebileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Çözdürme, İn vitro maturasyon, Sığır oositleri, Vitrifikasyon yöntemleri



**REPUCLIC of TURKEY**  
**BURDUR MEHMET AKIF ERSOY UNIVERSITY**  
**INSTITUTE of HEALTH SCIENCE**

MSc Thesis

The Achievements of In Vitro Maturation After Thawing to the Cryopreserved  
Bovine Oocytes by Different Vitrification Methods

Şöhret GÜLER

Department of Obstetrics and Gynecology

Supervisor

Dr. Öğr. Üyesi Afşin KÖKER

BURDUR – 2018

**ABSTRACT**

The purpose of this study; is freezing of immature bovine oocytes with vitrification methods of OPS and SSV and investigating the effects of these methods on maturation. The oocytes collected from the ovaries of the animals slaughtered in the local abattoir were examined under a stereomicroscope and 450 oocytes were used surrounded by at least 3 layers cumulus cells. According to the vitrification method, OPS, SSV and control groups were formed. Oocytes in the OPS group; were exposed TCM199 medium containing 20% CS, 10% EG and 10% DMSO for 30-45 seconds and vitrified by OPS method exposed TCM199 medium containing 20% CS, 20% EG, 20% DMSO and 0.5M sucrose for 20 seconds. Oocytes in the SSV group; were exposed TCM199 medium containing 20% CS and 4% EG for 12-15 minutes and vitrified by SSV method exposed TCM199 medium containing 20% CS, 35% EG, 5% PVP and 0.4 M trehalose for 25-30 seconds. The vitrified oocytes were thawed after storage in liquid nitrogen for at least 1 month and incubated for IVM. Oocytes in the control group were subjected to IVM without vitrified. The IVM procedure was performed in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 38.5 ° C for 24 hours using IVM medium (TCM199 medium containing 10% FCS, 5 µg/ml LH, 0.5 µg/ml FSH, 27.5 µg/ml Na-pyruvate and antibiotics). When examined to cumulus expansion after maturation, in the OPS group, 118 (80.82%) of 146 oocytes are degree 2, 22 (15.07%) oocytes are degree 1 and 6 (4.11%) oocytes are degree 0 cumulus expansion. In the SSV group, 113 (78.47%) of 144 oocytes are degree 2, 20

(13.89%) oocytes are degree 1 and 11 (7.64%) oocytes are degree 0 cumulus expansion. In the control group, 144 (96.00%) of 150 oocytes are degree 2, 4 (2.67%) oocytes are degree 1 and 2 (1.33%) oocytes are degree 0 cumulus expansion. When examined the polar body in the denuded oocytes, in the OPS group, 32 (23.19%) of 138 oocytes had polar body, 96 (69.56%) oocytes had no polar body and 10 (7.25 %) oocytes were degenerated. In the SSV group, 28 (20.90%) of 134 oocytes had polar body, 95 (70.90%) oocytes had no polar body and 11 oocytes (8.20%) were degenerated. In the control group, 108 (78.83%) of 137 oocytes had polar body, 25 (18.25%) oocytes had no polar body and 4 (2.92%) oocytes were degenerated. There was no significant difference between OPS and SSV groups ( $p>0.05$ ). Vitrification groups were significantly lower than the control group ( $p<0.001$ ). The result of the study shows that immature bovine oocytes can be vitrified with OPS and SSV methods.

**Keywords:** Thawing, In vitro maturation, Bovine oocytes, Vitrification methods.



## 1. GİRİŞ

Oositlerin kriyoprezervasyonu biyoloji, tarım ve tıpta önemli bir teknoloji haline gelmiştir. İn vitro embriyo üretimi (IVEP) için oositlerin in vitro maturasyonu (IVM), in vitro fertilizasyonu (IVF) ve in vitro kültürü (IVC) için optimal koşulların oluşturulmasında 1980'lerin başından bu yana önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu in vitro sistemler, çözdürülmüş oositlerin ve embriyoların kullanılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur ve bu tür biyomateryalleri daha etkin bir şekilde kriyoprezerve etmek için tasarlanan protokollerin değerlendirilmesini mümkün kılmıştır. İnsan, fare ve çiftlik hayvanları gibi türlerden elde edilen preimplantasyon dönemi embriyoların kriyoprezervasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş olsa da, çoğu memeli türünden elde edilen oositlerin kriyoprezervasyonu, suboptimal koşullara aşırı duyarlılıklarından dolayı kriyoprezervasyon çalışmaları çok daha zor olmuştur (Kumar, 2007). Kriyoprezervasyon terimi genel olarak yavaş, hızlı dondurma yöntemleri ile özellikle son dönemlerde ön plana çıkan vitrifikasyon tekniklerini kapsamaktadır.

Sunulan tez çalışması ile immatür sığır oositlerinin iki farklı vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup-çözdürülmesini müteakip IVM'e tabii tutularak vitrifikasyon yöntemlerinin IVM başarı oranlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma, ülkemiz genelinde reproduktif biyoteknoloji kapsamında, IVEP prosedürlerinin çeşitli aşamalarında manipülasyonu sağlayabilmek, daha sonraki in vitro embriyo üretiminde yeterli sayıda matür oosit ihtiyacını karşılayabilmek için yapılmıştır. Çalışmanın devamında İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) veya klasik IVF ile in vitro embriyo üretiminin yapılması ve üretilen embriyoların transfer edilmesi hedeflenmektedir.

### 1.1. Kriyoprezervasyonun Tarihi Gelişimi

Kriyobioloji canlı organizmalar üzerinde düşük sıcaklıkların etkilerini incelemektedir. İnsanlar uzun yıllar boyunca düşük sıcaklıkların hücreler ve dokular üzerinde yalnızca olumsuz etkilere neden olacağına inanıyordu. Kriyobioloji alanındaki ilerlemeler ve olanaklar hayal bile edilemezdi. Kriyobiolojinin tarihi

1600'lü yılların sonlarına dayanır. Henry Power, bir kavanoz içerisindeki tuzlu suda yılan balığını dondurup-çözdürdükten sonra, yılan balığının dondurulmadan önceki hali kadar aktif olduğunu gözlemlemiştir. Bu gözlem sonucunda soğğun öldürücü özelliğinin, aşırı ısıya maruz kalan canlılar kadar olmadığı teorisini ilk defa benimseyen kişi olmuştur. Robert Boyle, 1683 yılında, yaşayan hayvanlar üzerinde soğğun etkilerini tanımlayan “*New Experiments and Observations Touching Cold (Soğuk teması üzerine yeni deneyler ve gözlemler)*” adında bir monografi yayınlamıştır. Kriyobiolojideki diğer bir öncü olan Lazzaro Spallanzani, 1700’lü yılların sonlarında birçok türün dokusunda geniş çalışmalar yaparak dokuların düşük sıcaklıklardaki reaksiyonlarını incelemiştir (Luster, 2004).

Kriyobioloji için en önemli yıl 1938 yılı olmuştur; Basile J.Luyet ve Eugene L.Hodapp ilk başarılı sperm vitrifikasyonunu yayınlamışlardır. Ayrıca Basile J.Luyet ve Eugene L. Hodapp, küçük damlalar ve 2 mol/L sükröz kullanarak ilk defa başarılı bir şekilde kurbağa spermalarının vitrifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Luyet kolloidler (jelatin, süt veya agar gibi) ile yaptığı araştırmaya göre vitrifikasyonun başarı olasılığının kolloidlerin su içeriğine bağlı olduğunu ortaya koymuştur (Arav, 2014).

B.J. Luyet ve Marie Pierre Geheio, kriyobioloji için gerekli temel komponentleri özetleyerek, “*Life and Death at Low Temperatures (Düşük ısı derecelerinde yaşam ve ölüm)*” adındaki kitaplarını 1940 yılında yayınlamışlardır (Luyet ve Geheio, 1940). Söz konusu kitapta bahsi geçen büyük Fransız kimyager ve fizikçi Joseph Louis Gay-Lussac, minimum damla hacmi (MDS), bir başka deyişle düşük hacimli vitrifikasyon yöntemini 19. yüzyılın başlarında tarif ederek dikkate aldığı bilinmektedir. Gay Lussac, gaz yasaları ve alkol-su karışımları konusundaki çalışmaları ile bilinmektedir. Vitrifikasyon ilkelerinin keşfi ile suyun dondurulmaksızın -12°C’ye soğutulabileceğini Gay Lussac 1836 yılında bildirmiştir (Arav 2014).

Christopher Polge ve Cambridge Üniversitesindeki meslektaşları 1940’ların sonunda yanlış etiketlenmiş kimyasal şişeleri kullanarak tesadüfen gliserolün koruyucu özelliğini keşfetmişlerdir. Bu tesadüfi keşif, horoz ve sığır spermatozoalarının başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonuna olanak vermiştir (Polge

ve ark., 1949). Donma hasarına karşı gliserolün hücreleri koruma yeteneğinin keşfi, kriyobiyoloji biliminin türetilmesini sağlamıştır. Dondurulup-çözdürülen sığır spermatozoalarının suni tohumlamada kullanılması ile üretilen ilk buzağı 1951 yılında doğmuştur. Peter Mazur, düşük sıcaklıklara maruz kalan ve donan mikroorganizmaların yanıtlarını modellemek için 1960 yılında kapsamlı deneyler yapmıştır. Bu çalışmalar şu anda kriyobiyoloji olarak bilinen bilim dalının gelişmesine neden olmuştur (Mazur, 1963; Mazur, 2004).

Üreme fizyolojisi alanında, gamet ve embriyoların kriyoprezervasyonunda kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. En eski çalışmalar, spermatozoanın kriyoprezervasyonunu içermektedir. Spermatozoanın başarılı bir şekilde saklanması, birçok türde suni tohumlama yönteminin kullanımını pratikleştirmiştir. Sığır yetiştiricilerine ait sıvı azot (LN<sub>2</sub>) tanklarında dondurulmuş sperma payetlerinin muhafazası dünyanın birçok yerinde yaygınlaşmıştır. Kriyobiyolojideki ilerlemeler, sürüler arasında genetik çeşitliliğin artmasını da kolaylaştırmıştır. (Luster, 2004)

Whittingham ve ark. (1972) fare embriyolarını dondurup-çözdürdükten sonra alıcı farelere transfer ederek yavrular elde etmiştir. Bahsi geçen araştırmacılar bu çalışma ile hayvan türü embriyosunu başarılı şekilde donduran ilk kişiler olmuştur. Sağırkaya (2001)'nin bildirdiğine göre, 1973 yılında Wilmot ve Rawson tarafından dondurulmuş sığır embriyosundan buzağı elde edilmiştir. Bu çalışmalardan sonra, embriyo kriyoprezervasyonu diğer türlerde de uygulanmaya başlanmıştır. Bu uygulama 1980'lerde sığır üreticileri için standart bir prosedür haline gelmiştir. Kriyoprezerve insan embriyolarından elde edilen gebelik kendiliğinden abortus ile sonuçlanmasına rağmen, insanlarda gebelik ilk kez Trounson ve Mohr (1983) tarafından bildirilmiştir. Dondurulmuş insan embriyolarının transfer edilmesi ile gerçekleşen ilk doğumlar Zeilmaker ve ark. (1984) tarafından bildirilmiştir. Bu başarılar embriyo kriyoprezervasyonunun beşeri hekimlik alanında da yaygınlaşmasına olanak sağlamıştır. Oositlerin ve embriyoların dondurulması için yıllar boyunca çeşitli protokoller oluşturulmuştur (Rall, 1992).

Oositlerin dondurulması üzerine yapılan ilk çalışmalar, fare ve hamster oositleri ile yapılmıştır (Martino ve ark., 1996b). Bu ilk çalışmalar kapsamında, yavaş dondurma yöntemiyle dondurulmuş oositlerin %6 ile %14'ünden, vitrifikasyon

yöntemiyle dondurulan oositlerin ise %20 ile %38'inden fetüs veya yavru üretilmiştir (Rall, 1992). Vitrifikasyon yöntemi, yavaş dondurma yöntemine alternatif olarak geliştirilmiştir. Rall ve Fahy (1985) tarafından ilk kez vitrifikasyon yöntemiyle memeli embriyoları dondurulmuştur. Sığır embriyoları ise ilk kez 1987 yılında vitrifikasyon tekniği ile dondurulmuştur (Massip ve ark., 1987). Nakagata (1989), Miyake ve ark., (1993) fare oositlerini vitrifikasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde dondurmuşlardır. İlk kez Lim ve ark. (1991) metafaz II (M II) dönemindeki sığır oositlerini dondurup-çözdürmüş ve blastosist dönemine kadar kültüre etmiştir. Dondurulan oositlerden elde edilen ilk canlı buzağı ise Fuku ve ark., (1992) tarafından bildirilmiştir. Arav ve ark., (1993b) immatür sığır oositlerinin vitrifikasyonuna uygun bir solüsyon bulmak için çalışmalar yapmıştır. Otoi ve ark., (1994) ise sığır oositlerinin gelişme yeteneği ve soğutma oranları arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. İmmatür oositlerin kriyoprezervasyonu ele alındığında, farelerde (Eroglu ve ark., 1998a), sığırlarda (Suzuki ve ark., 1996a), mandalarda (Wani ve ark., 2004), domuzlarda (Isachenko ve ark., 1998), insanlarda (Tucker ve ark., 1998) ve diğer türler genelinde, temel araştırma ve ticari uygulamalarda önemli ölçüde ilerlemiştir (Liang ve ark., 2012). Oosit kriyoprezervasyonu sonrasında meydana gelen ilk doğumların listesi tablo 1.1.'de verilmiştir (Kumar, 2007).

Vajta ve ark., (1998) açık uçlu modifiye payet (OPS) yöntemiyle, Lane ve ark. (1999) kriyolop yöntemiyle, Papis ve ark., (2000) minimum damla hacmi yöntemiyle, Dinnyes ve ark. (2000), katı yüzey vitrifikasyon (SSV) yöntemiyle ve Kuwayama ve ark., (2005b) kriyotop yöntemiyle blastosist elde etmeyi başarmışlardır (Aksu, 2010). Dondurulmuş embriyolardan elde edilen yavrularla ilgili tarihsel gelişim süreci tablo 1.2.'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.1.** Memeli oositlerin başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu sonrasında meydana gelen ilk doğumlar (Kumar, 2007).

<b>Türler</b>	<b>Yıl</b>	<b>Yöntem</b>	<b>Araştırmacılar</b>
Fare	1976	Yavaş dondurma	Parkening ve ark.,
	1991	Vitrifikasyon	Kono ve ark.,
Tavşan	1989	Yavaş dondurma	Al-Hasani ve ark.,
	1989	Vitrifikasyon	Vincent ve ark.,
Sığır	1992	Yavaş dondurma	Fuku ve ark.,
	1998	Vitrifikasyon	Vajta ve ark.,
İnsan	1986	Yavaş dondurma	Chen
	1999	Vitrifikasyon	Kuleshova ve ark.,
At	2002	Vitrifikasyon	Maclellan ve ark.,

**Tablo 1.2.** Donmuş embriyodan doğan yavruların tarihsel gelişimi (Gordon, 2003; Kaymaz, 2015).

<b>Yıl</b>	<b>Tür</b>	<b>Araştırmacılar</b>
1972	Fare	Whittingham ve ark.,
1973	İnek	Wilmot ve Rawson
1974	Tavşan	Bank ve Maurer
1974	Koyun	Willadsen
1975	Rat	Whittingham
1976	Keçi	Bilton ve Moore
1982	At	Yamamoto ve ark.,
1984	İnsan	Zeilmaker ve ark.,
1985	Hamster	Ridha ve Dukelow
1988	Kedi	Dresser ve ark.,
1989	Domuz	Hayashi ve ark.,
1989	Rhesus Maymunu	Wolf ve ark.,



## 1.2. Kriyoprezervasyonun Önemi

Oositlerin kriyoprezervasyonu tam olarak optimize edildiğinde, hayvanlar ve insanlar için birçok uygulama alanları oluşacaktır. Özellikle çiftlik hayvanları bağlamında, prepubertal, infertil ve gebe olan hayvanlardan oositler Ovum Pick-Up (OPU) yöntemi ile alınabilmektedir (Jin ve ark., 2016). Ayrıca oositler, ölmüş olan değerli hayvanların ovaryumlarından in vitro yöntemler ile alınabilmektedir. Herhangi bir kaynaktan toplanan oositler, oosit bankaları şeklinde depolar oluşturmak için kriyoprezerve edilebilir. Oosit kriyoprezervasyonu sayesinde dışilerden elde edilen değerli genetik materyal saf bir şekilde korunabilmektedir ve bu yüzden dondurulmuş embriyolar yerine oositler tercih edilebilir. Ayrıca, üstün gamet plazmasının daha hızlı çoğaltılması için canlı yavru üretiminde, klonlama veya transjenik çiftlik hayvanlarının üretimi gibi yardımcı üreme teknolojilerinde ve embriyonik kök hücrelerin üretiminde kullanılmak üzere dondurulup-çözdürülmüş oositler istenilen uygun zaman dilimlerinde kullanılabilir (Kumar, 2007). Bununla birlikte, kesilmiş veya ölmüş dişi hayvanlardan elde edilen oositler kısa sürede dejenere olmaktadır. Bu yüzden oositlerin kriyoprezervasyonu, embriyo üretimi sürecinde hazır oosit teminini kolaylaştıracaktır (Paytner, 2000).

Nesli tükenmekte olan hayvan türlerinin dişi genetik materyalinin, oosit kriyoprezervasyonu sayesinde muhafaza edilmesi ile geriye kalan popülasyon neslinin devam etmesi sağlanabilir (Holt ve ark., 2004). Şu anda, tüm nesli tükenmekte olan türlerin kriyobiyolojisi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu nadir türlerin oosit kriyoprezervasyonu, yardımcı üreme teknolojilerinin (ART) kullanımı hazır hale gelene kadar oositlerin korunmasına izin verecektir. Ayrıca, oosit kriyoprezervasyonu, transgenik hayvan soy hatlarının uzun ömürlü olmasına ve üretilmesine yardımcı olabilir. Transgenik fareler zayıf üreme kabiliyetine sahip olma eğilimindedir ve bu farelerin üretimi uzun ve maliyetli bir işlemdir (Cecim ve ark., 1995). Değerli transgenik fare türleri gibi laboratuvar hayvanlarından alınan oositler, kriyoprezerve edilerek korunabilir. İnsanlarda, embriyolar yerine oositlerin uzun süreli depolanması, embriyoların depolanmasıyla ilgili yasal, etik ve ahlaki sorunların azaltılmasına yardımcı olacaktır (Gosden ve Nagano, 2002). Oositlerin depolanarak daha sonra kullanılması, eşi olmayan kanser hastalarının genetik

materyallerinin muhafazasına olanak sağlayacaktır (Fabbri ve ark., 2001; Porcu ve ark., 2004). Ovaryan hiperstimülasyon sendromu, konjenital infertilite bozuklukları, turner sendromu, kist, endometriozis gibi hastalıklarda ve erken menopoz riski taşıyan kadınlarda oositlerin dondurulması önemli bir avantaj sağlamaktadır (Kumar, 2007; Porcu ve ark., 2000).



## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kriyoprezervasyonda Kullanılan Malzemeler**

Kriyoprezervasyonda kullanılan malzemeler laboratuvar cihazları ve demirbaş nitelikli materyal, sarf ve diğer malzemeler, kriyoprotektan (KP) özellikteki maddeler ve medyum katkı maddeleri başlıkları altında incelenmiştir.

#### **2.1.1. Laboratuvar Cihazları ve Demirbaş Nitelikli Materyal**

Azot tankı; -196°C'deki sıvı azotu içeren ve dondurulmuş oositlerin saklanması amacıyla kullanılan tanktır.

Steromikroskop; oositlerin veya embriyoların aranması, seleksiyonu, vitrifikasyonu ve çözündürülmesi gibi işlemlerin manipülasyon prosedürleri için kullanılan mikroskoptur. Steromikroskop tablasının istenilen sıcaklığa ayarlanabilir olması, oosit ve embriyoların ısı stresine girmemesi için önemlidir. Ayrıca konum bakımından steromikroskobun hava filtrelerinin hemen altında bulunması, ısı dalgalanmalarına neden olacağından istenmez (Weikert ve ark., 2012).

Laminar flow kabin; bir çeşit laminar akış kabinidir ve steril kabin olarak da bilinmektedir. Laminar flow kabin, steromikroskop ile deneylerde çalışırken HEPA-filtre ile tozdan ve partikülden arındırılmış hava sağlamak amacıyla kullanılır. Oda içerisindeki hava, kabin içine alınır ve bir HEPA filtreden geçmesiyle filtrelenen hava, laminar flow kabin içerisinden geçerek odaya geri döner. Dolayısıyla laminar flow kabin içerisindeki cihaz ve malzemelerin yanı sıra oosit ve embriyolarda toz ve partiküllerden korunmuş olur (Anonim, 2016). Laminar flow kabin içerisinde kullanılan filtrelerde oluşan delikler, filtrelerin partikül tutma özelliklerini ortadan kaldırır. Bu yüzden filtrelerin üretici firmanın tavsiye ettiği süreler (ortalama 6.000 ile 10.000 saat) içinde değiştirilmesi gereklidir (Özatic, 2011).

Etüv; medyumların gazlanması (medyumların pH'sının dengelenmesi) ve ısınmasında, immatür oositlerin maturasyonu, matür oositlerin fertilizasyonu, embriyoların gelişiminden transferine kadar geçen tüm süre neredeyse etüv içinde

geçmektedir. Bu yüzden etüvler, laboratuvarın en önemli cihazlarından biridir. Tek kapaklı etüvler, çok bölmeli iç kapaklı etüvler ve masa üstü tek veya çok kapaklı etüvler mevcuttur. Çok bölmeli iç kapaklı etüvler, tek kapaklı etüvlere göre daha çok avantajlı ve kullanışlıdır. Çok bölmeli iç kapaklı etüvlerde her bölmenin ayrı bir kapağının olması, kullanılmayan diğer bölümlerin atmosferini etkilemez ve böylece etüvde bulunan hücrelerin gelişimi, olumsuz yönde etkilenmemiş olur. İşlem yapılan bölmenin iç hacmi küçük olduğu için kapak kapandığında bölme içinde istenen atmosfer düzeyi saniyeler içinde optimum düzeye ulaşmaktadır (Özatic, 2011). CO<sub>2</sub>'li etüvlerde CO<sub>2</sub> dijital değeri göstergesinin doğru gösterip göstermediği düzenli bir şekilde kontrol edilmelidir. Etüv içerisindeki gerçek gaz içeriğini izlemek için bir gaz analizörü kullanılır. Gaz analizöründe ölçülen değer, etüv üzerinde görüntülenen dijital değerle karşılaştırılır ve gerektiğinde ayarlamalar yapılır. Etüvün ayarlarını belirlemek için gaz analizörü ile birlikte pH metre de kullanılır. Ticari olarak hazırlanmış medyumların pH'sı genellikle 7.2 ile 7.4 aralığındadır. Etüv içerisinde kültürlenmiş medyum pH'sının istenilen düzeyde olup olmadığından emin olmak için medyumun düzenli olarak pH'sına bakılmalıdır. Bu pH değerleri, bir etüvün CO<sub>2</sub> ayarının ana belirleyicisi olmalıdır (Weikert ve ark., 2012).

Su arıtma sistemi, etüvün nemlendirilmesi ve medyum hazırlanmasında kullanılması için sınırsız ultra saf su üretir.

Osmometre, solüsyonların osmolaritesini ölçmek için kullanılır. Ticari olarak hazırlanan medyumların osmolaritesi genellikle 260 ile 290 arasındadır. Osmolarite çoğu laboratuvarda yaygın olarak yapılan bir test değildir; bununla birlikte yılda iki defa yapılan yeterlilik testi, kültür medyumunu için gerekli bir testtir (Weikert ve ark., 2012).

pH metre; hazırlanan medyumların pH'sının ölçülmesinde kullanılır.

Hassas terazi; medyum içerisine katılacak toz kimyasalların tartılması için kullanılır.

Mikropipetler; medyum içine katılacak sıvı kimyasal miktarının belirlenmesi, damla hazırlanması ve kaplar arasında sıvı kimyasalların aktarılması gibi birçok yerde kullanılmaktadır. Mikropipet hacim miktarları 0.2 µl ile 1.000 µl arasında

değişmektedir. Kullanılacak miktarlar mikrolitre cinsinden olduğu için ölçümlerin çok hassas olması gerekir. Bu nedenle mikropipet kalibrasyonlarının düzenli ve dikkatli bir şekilde yapılması gerekir.

Vorteks; yüksek hızda titreşim prensibiyle çalışan bir cihazdır. Vitrifikasyon medyumlarının karıştırılmasında ve medyumun bir örnek haline getirilmesinde kullanılır (Özatic, 2011).

Bunzen beki; cam pastör pipetlerinin modifiye edilmesinde kullanılır.

### **2.1.2. Sarf ve Diğer Malzemeler**

Ovaryum taşıma kapları; mezbahadan elde edilen ovaryumların laboratuvara taşınmasında kullanılan kapalı termoslardır.

Oosit aspirasyon iğneleri; genelde 18 veya 19 Gauge (G)'luk iğnelerdir ve oositlerin aspirasyon işleminde foliküllerden folikül sıvısıyla birlikte oositleri aspire etmek için kullanılır.

Konik tabanlı 15 ml ve 50 ml'lik plastik tüpler; oosit aspirasyonu sırasında aspire edilen folikül sıvısının toplanması, oositlerin yıkanması ve medyum hazırlanması gibi işlemlerde kullanılan tüplerdir.

Mikropipet uçları; medyumların hazırlanmasında ve damla oluşturmak için kullanılır.

Pastör pipetleri; oositlerin manipülasyonlarında ve oositlerin bir medyumdan diğer medyuma aktarılmasında kullanılır.

Petri kapları (60, 90 mm'lik) oositlerin seleksiyonu, vitrifikasyonu ve çözdürülmesi gibi işlemlerde medyumların taşıma kabı olarak kullanılır.

*Cryostore cane*; kriyotüplerin sıvı azot tankına dizili ve düzenli bir şekilde konulmasını sağlayan metal taşıyıcı kaplardır.

Payetler (0.25 ml'lik); kolay manipüle edilebilmeleri, ucuz olmaları ve kolay bulunabilmeleri nedeniyle oositlerin ve embriyoların dondurulmasında birçok

araştırmacı tarafından tercih edilmektedir. Payet ilerinin dondurma işleminden önce medyumlarla yıkanması, payetlerde olabilecek olası toksik maddelerin giderilmesi sağlanmaktadır (etin, 2004).

Oosit veya embriyolar vitrifikasyon tekniğiyle kriyoprezerve edildiğinde buz kristali oluşumu, yüksek konsantrasyonlu kriyoprotektan ve yüksek soğuma ve ısınma oranları kullanılarak önlenir. Vitrifikasyon tekniğinde sıcaklığın hızlı bir Şekilde düşmesi iki avantaj sağlayabilmektedir. Bu avantajlardan biri soğuma hızının arttırılmasına bağlı olarak kriyoprotektan konsantrasyonunun azaltılması sonucunda hücredeki osmotik ve toksik etkilerin minimal düzeye indirilmesidir. Diğer bir avantaj ise tehlikeli sıcaklık aralığından (+15 ile -5 C) hızlı bir Şekilde geçildiği için soğuk hasarının daha az Őekillenmesidir. Vitrifikasyon tekniğinde, embriyoların dondurulması, depolanması ve zdrlmesinde standart Fransız mini payetler kullanılmaktadır. Ancak bu payetlerde maksimum soğuma ve ısınma oranları 2.000 C/dk ile sınırlanarak yetersiz kalmıştır. Sıvı azot içerisine embriyoların doğrudan damlatılması (Riha ve ark., 1991) veya soğuma ve ısınma sürecinde embriyoları desteklemek için elektron mikroskopik ızgaraların kullanılması (Martino ve ark., 1996b) gibi embriyoyu içeren medyum ile sıvı azot (soğuma ve ısınma oranlarını arttıran) arasında doğrudan temas sağlayan alternatif teknikler yayınlanmıştır. Vajta ve ark. (1998), vitrifikasyon tekniğindeki soğuma ve ısınma oranlarını arttırmak için OPS adı verilen yeni bir teknik geliştirmiştir. OPS payetleri, klasik 0.25 ml'lik payetlerin ısıtılıp, çekilerek uzatılması ile elde edilen modifiye payetlerdir. OPS payetleri, klasik payetlere göre daha küçük hacimli ve daha ince bir çepere sahiptir. Modifiye payetler (OPS gibi) yaklaşık olarak 22.500C/dk'lik soğuma oranı sağlayabilmektedir. Fakat OPS payetin iki ucu açık olduğundan dolayı kriyoprezerve edilen materyalin kontaminasyon riski bulunmaktadır. Bu risk, bakteri ve mantarlar (0.2 m gözenek boyutu) için uygun olan filtreden geçirilen sıvı azotun kullanılmasıyla ve daha sonra tıklalı bir normal payet içine OPS payetinin dar uç kısmından yerleştirilerek diğer ucunun mhrlenmesiyle indirgenebilir. Tüm bu maniplasyonlar sıvı azot veya sıvı azotun buharında yapılmalıdır. Normal payet OPS payetinin açık ucunu kapattığı için daha sonraki depolama veya ısınma işlemlerinde steril sıvı azota gerek yoktur (Vajta ve ark., 1998). Hurtt ve ark. (2000), hem immatür hem de matür at ve sığır oositlerinin, OPS payetleri kullanılarak

başarılı bir şekilde vitrifikasyonunu bildirmiştir. Bununla birlikte hayatta kalma oranlarının sığır oositlerine kıyasla at oositlerinde daha düşük olduğunu bildirmiştir.

**Tablo 2.1.** Yüzey Sistem Vitrifikasyon Gereçleri (Kumar Paul, 2014).

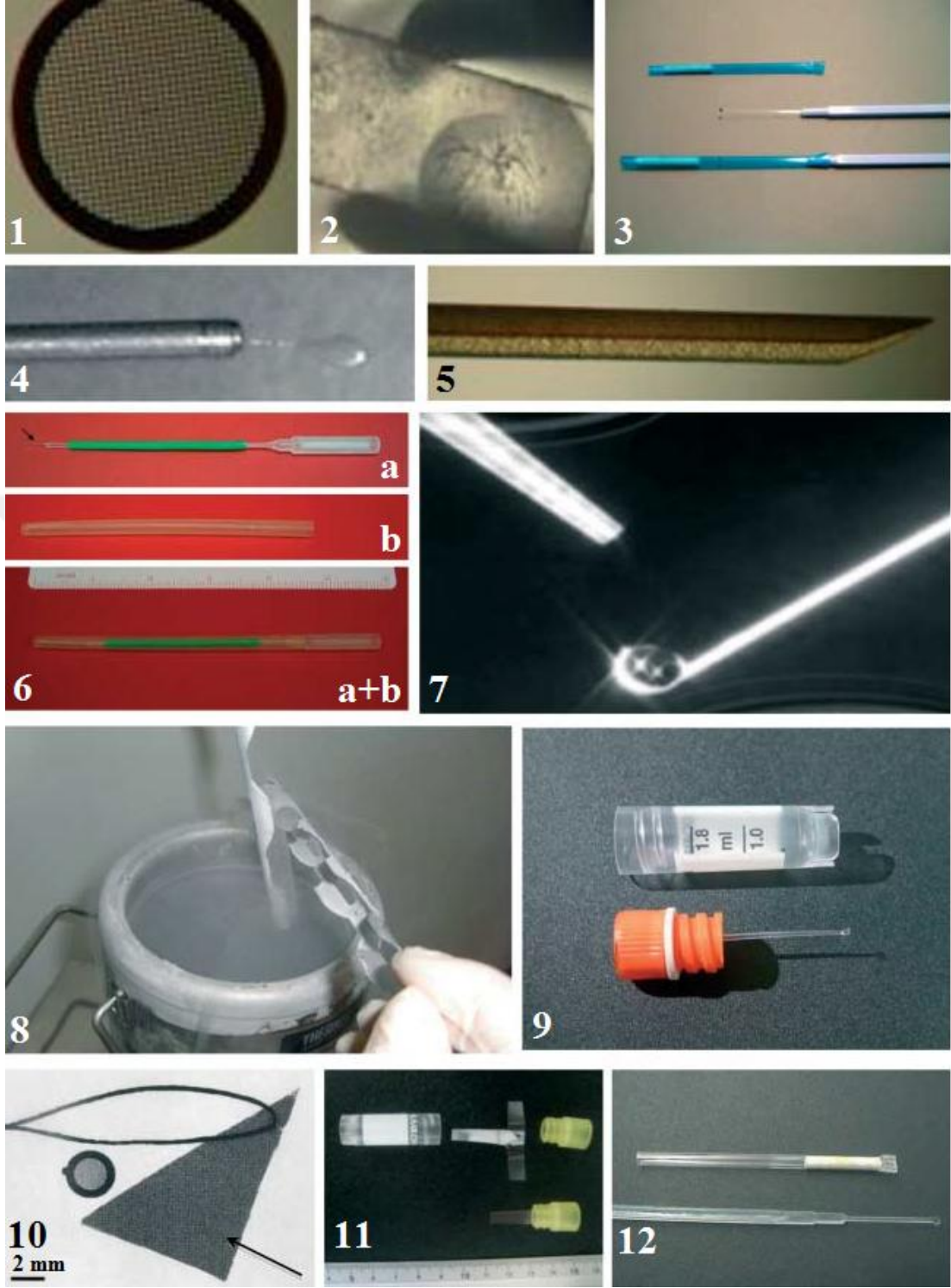
Gereç Adı	Referans
Elektron mikroskopik (EM) ızgara	Steponkus ve ark., 1990; Martino ve ark., 1996b; Cho ve ark., 2002
MDS	Arav ve Zeron, 1997; Yavin ve Arav, 2001; Arav ve ark., 2002
Kriyotop	Kuwayama ve ark., 2005a; Roy ve ark., 2014; Wu ve ark., 2017a
Kriyoloop	Lane ve ark., 1999
Yarım payet	Vanderzwalmen ve ark., 2000
SSV	Dinnyes ve ark., 2000
Naylon mesh	Matsumoto ve ark., 2001
Kriyoleaf	Chian ve ark., 2005
Direct cover vitrifikasyonu	Chen ve ark., 2006
Fibre plug	Muthukumar ve ark., 2008; Şaylan, 2011
Vitrifikasyon spatulası	Tsang ve Chow, 2009
Kriyo-E	Petyim ve ark., 2009
Plastic blade	Sugiyama ve ark., 2010
Vitri-Inga	Almodin ve ark., 2010

Arav ve ark. (2002), Yavin ve Arav'ın (2007) gözlemlerine göre daha küçük solüsyon hacmi, vitrifikasyon olasılığını arttırmıştır. Hacimlerin daha küçük olması, ısı transferinin daha iyi olmasını sağlar ve böylece daha yüksek soğuma oranları elde edilir. Araştırmacılar, örnek hacmini azaltmak ve hücrelerin canlılığını arttırmak için yöntemleri kendi aralarında uyumlandırmaya çalışmıştır. Yöntemler genellikle yüzey (Tablo 2.1, Şekil 2.1) ve tüplü (Tablo 2.2, Şekil 2.2) yöntemler olarak iki kategoriye ayrılabilir. Yöntemlerde kullanılan gereçlerin avantaj ve dezavantajları tablo 2.1' da tartışılmıştır (Kumar Paul, 2014).

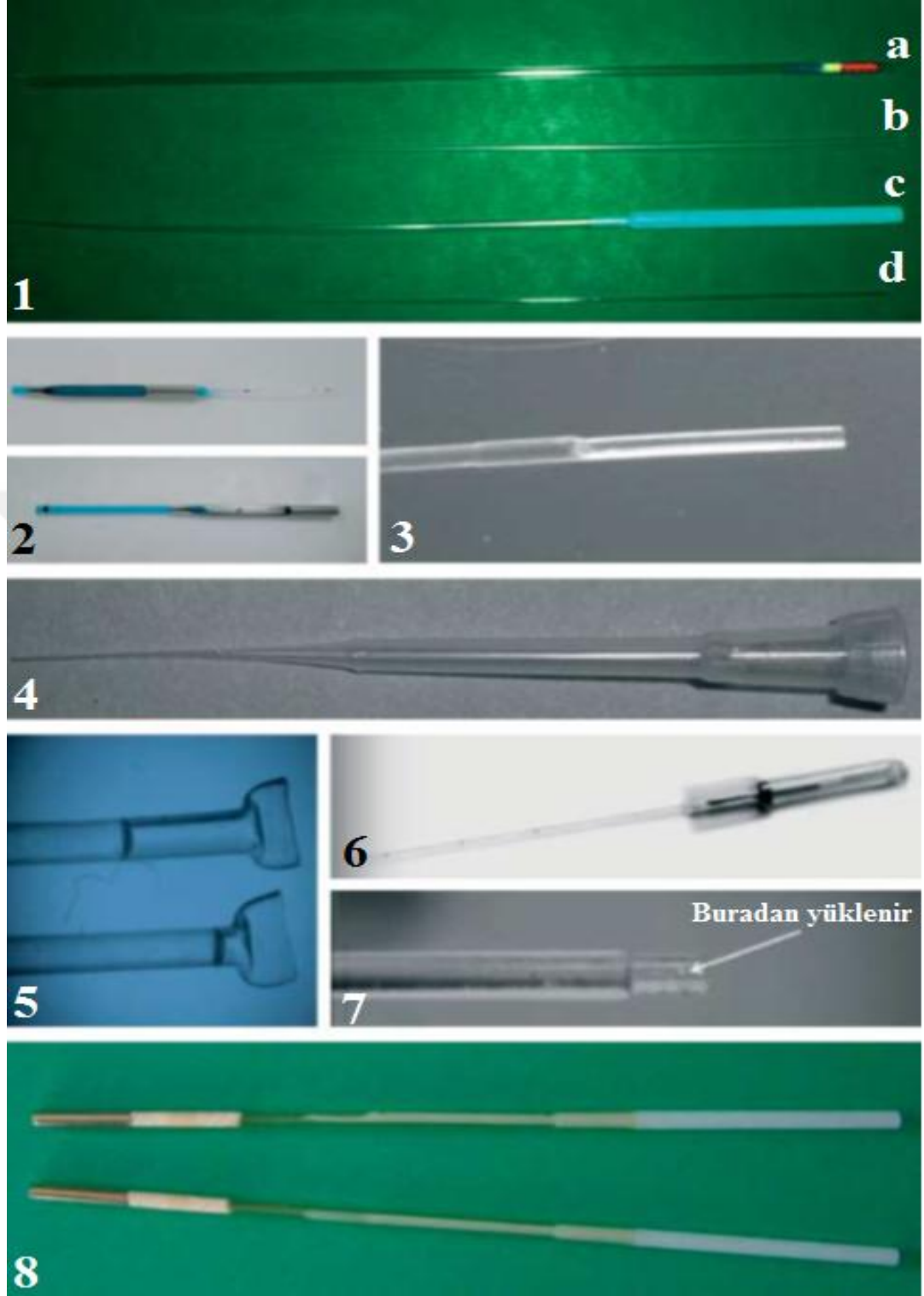
**Tablo 2.2.** Tüplü Sistem Vitrifikasyon Gereçleri (Kumar Paul, 2014).

<b>Gereç adı</b>	<b>Referans</b>
Plastik payet	Çetin, 2004; Bagis ve ark., 2005; Zhao ve ark., 2007
OPS	Vajta ve ark., 1998; Chen ve ark., 2001; Wu ve ark., 2017b
Kapalı uçlu modifiye payet (CPS)	Chen ve ark., 2001
Flexipet-denuding pipet	Liebermann ve ark., 2002
Superfine OPS	Isachenko ve ark., 2003
Kriyotip	Kuwayama ve ark., 2005a; Portmann ve ark., 2010
Pipet ucu	Sun ve ark., 2008
Yüksek güvenilir vitrifikasyon	Camus ve ark., 2006
Mühürlenmiş modifiye payet	Yavin ve ark., 2009
Kriyopette	Portmann ve ark., 2010
Rapid-i	Larman ve Gardner, 2010
Hollow fiber	Matsunari ve ark., 2012





**Şekil 2.1.** Vitrifikasyon yüzey taşıyıcı sistemleri. (1) Elektron mikroskobik ızgara, (2) minimum damla hacmi, (3) kriyotop, (4) kriyoloop, (5) yarım payet, (6) kriyoleaf, (7) fibre plug, (8) direct cover vitrification, (9) vitrifikasyon spatulası, (10) naylon mesh, (11) plastic blade, (12) vitri-inga (Saragusty ve Arav, 2011).



**Şekil 2.2.** Vitrifikasyon tüplü taşıyıcı sistemleri. (1, a) Plastik payet, (1, b) açık uçlu modifiye payet, (1, c) superfine OPS, (1, d) flexipet-denuding pipet, (2) kriyotip, (3) yüksek-güvenilir vitrifikasyon, (4) pipet ucu, (5) mühürlenmiş modifiye payet, (6) kriyopette, (7) rapid-i ve (8) JY payet (Saragusty ve Arav, 2011).

**Tablo 2.3.** Vitrifikasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları (Kumar Paul, 2014).

<b>Vitrifikasyon Yöntemi</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
Kriyotop (Kuwayama ve Kato, 2000)	-Medyum hacmi kolayca edilir. -Kullanılması pratiktir.	-Pahalıdır (yaklaşık 40 USD/ gereç). -Kriyotop üzerinden medyum ile numunenin akmasıdır.
Kriyotip (Kuwayama ve ark., 2005a)	-LN <sub>2</sub> ile daha az kontaminasyon ihtimalinin olmasıdır. -Çözürdürmesi pratiktir.	-Kılıfın yüklenmesi, mühürlenmesi, ayarlanması ve daldırılması için gereken süredir. -Pahalı ekipman gerektirir.
SSV (Dinnyes ve ark., 2000)	-Yüksek soğutma oranı sağlar. -Nispeten ucuzdur. -Kısa sürede çok sayıda numune korunabilir.	-Geniş ölçüde yapılan pratiklik gerektirir. -Oositler bazen iç yüzeye yapışır. -Oosit kaybı olasılığı yüksektir.
Kriyoloop (Oberstein ve ark., 2001)	-Yüksek soğutma oranı sağlar. -Küçük halkadan dolayı solüsyon hacmi en aza iner.	-Pahalıdır (yaklaşık 30 USD/ gereç). -Daha fazla pratiklik gerektirir. -Oosit kaybı olasılığı yüksektir.
OPS (Vajta ve ark., 1998)	-En yüksek soğutma oranını sağlar. -İki boyutu mevcuttur (0.30 ve 0.65 mm iç çap) -OPS'in kapillar kuvvetleri sayesinde "otomatik yükleme" şeklinde yükleme işlemi kolaydır. -OPS payetinin hazırlanması kolaydır.	-Çözme sırasında kırılma ihtimali yüksektir. -Daha fazla pratiklik gerektirir. -Bazen zamanın sağlanması zordur. -Daraltması zordur. -Modifiye payetin ucu açık olduğundan dolayı kontaminasyon riski vardır (Vajta ve ark., 1998).

**Tablo 2.3.** Vitrifikasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları (devamı).

<b>Vitrifikasyon Yöntemi</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
Hollow fiber (Matsunari ve ark., 2012)	-Bir seferde çok sayıda embriyo korunabilir. -Yüksek soğutma oranı sağlar. -Embriyo sağkalım oranı yüksektir.	-Pahalı bir ekipman gerektirir. -Yükleme sırasında embriyoların mekanik hasar görme olasılığı yüksektir.
Minimum Damla Hacmi (Papis ve ark., 2000)	-Yüksek soğutma oranı sağlar. -Ekstra gereç gerektirmez. -Kriovial ile korunabilir.	-Oosit kaybı olasılığı yüksektir. -LN <sub>2</sub> içine yerleştirmek ve damlatmak için daha fazla pratiklik gerektirir.
Vitrifikasyon spatulası (Tsang ve Chaw, 2009)	-Yükleme kolaydır. -Taşıma kolaydır.	-Pahalı ekipman gerektirir. -Soğutma oranı nispeten düşüktür.
Vitri-inga (Almodin ve ark., 2010)	-Yüksek soğutma oranı sağlar. -Fare embriyolarının vitrifikasyonu için yaygın olarak kullanılır.	-Pahalı ekipman gerektirir. -Taşıma sırasında ince parçaların kırılma olasılığı yüksektir.
Kriyoleaf (Chian ve ark., 2005)	-Hızlı soğutma oranı sağlar. -Daha fazla pratiklik gerektirmez.	-Pahalı ekipman gerektirir. -Yükleme biraz zordur.
Hemi-payet (Vanderzwalmen ve ark., 2000)	-Yüksek soğutma oranı sağlar. -Sabit sonuçlar verir.	-Pahalıdır. -Numune, çözdürme sırasında kaybolabilir. -Taşıma sırasında kırılabilir.

Vitrifikasyon için birçok farklı protokolün ve taşıyıcı sistemlerin olması, vitrifikasyon sonuçlarını daha da karmaşıklarıştırmaktadır. Başarılı bir vitrifikasyon programı için anahtar olan ek değişkenler (a) kriyoprotektanların türü ve konsantrasyonu, (b) oosit ve embriyonun maruz kaldığı sıcaklık ve zaman, (c) soğutma ve ısınma oranları, (d) oosit veya embriyoların sıvı azot ile doğrudan temas edip etmediğidir. Tüm bu değişkenler elle gerçekleştirildiğinde vitrifikasyon prosedürünü, standartlaştırmayı zorlaştırır. Sıvı azot içine son daldırma dahil olmak üzere oositlerin veya embriyoların, çeşitli dengeleme solüsyonlarına ve vitrifikasyon solüsyonlarına hassas bir şekilde maruz kalmasını sağlayan otomatik bir cihaza sahip olunması, yukarıda bahsedilen tüm dezavantajların üstesinden gelecektir. Fertilesafe Ltd., Sarah® (şekil 2.3) adlı bir cihaz geliştirmiştir. Arav ve ark. (2018), fare ve sığır oositleri ve embriyolarını Sarah adlı otomatik vitrifikasyon cihazında vitrifiye ederek ilk kez bu cihazın başarılı sonuçlarını bildirmiştir.



**şekil 2.3.** Sarah cihazının iki resmi. A) LCD ekranlı kapalı cihaz, B) Payet ile birlikte robotik kolu, solüsyonları ve sıvı azot konteyneri ile birlikte dönen metal plağı gösteren açık cihaz (Arav ve ark., 2018).

### 2.1.3. Kriyoprotektan Özellikteki Maddeler

Kriyoprotektanlar, dondurma ve çözündürme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır (Alçolak, 2009; Palasz ve Mapletoft, 1996; Sağırkaya ve Bağış, 2003).

Kriyoprotektan maddeler, hücre membranından geçebilme özelliklerine göre iki ayrı grupta incelenmektedir:

- 1) Hücre membranından geçebilen (hücre içerisine girebilen, intraselüler, permeabl),
- 2) Hücre membranından geçemeyen (hücre içerisine giremeyen, ekstraselüler, non-permeabl) kriyoprotektanlardır (Alçolak, 2009; Sağırkaya ve Bağış, 2003).

İntraselüler kriyoprotektanlar, toksisitesi az, suda iyi çözünen, düşük moleküler ağırlığına sahip olup hücre içine girerek su moleküllerini hücre dışına çıkarırlar (Gümüş, 2014; Orieff ve ark., 2005). İntraselüler kriyoprotektanlar, metanol (32.04), etilen glikol (62.07), propilen glikol (1,2 propanediol, 76.10), dimetil sülfoksit (78.13), 2,3 bütanediol (90.12), gliserol (92.1) ve diğer alkollerini içermektedir (Palasz ve Mapletoft, 1996). Kriyoprotektanların koruyucu etkileri, suyla hidrojen bağları oluşturarak, buz kristallerinin boyutlarını küçültmeleriyle ortaya çıkmaktadır. Gliserol ve propanediol (PROH), bu işi hidroksil grupları ile (-OH) yaparken dimetil sülfoksit (DMSO) oksijen atomu sayesinde yapmaktadır. Kriyoprotektanlar, medyumun donmadan kalan kısmındaki elektrolit konsantrasyonunu azaltmaları (Porcu, 2001), dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların meydana getirdiği ozmotik büzülmeyi azaltmaları ile koruyucu etki göstermektedirler. İntraselüler kriyoprotektanlar buz kristallerinin oluşumunu -40°C'ye kadar düşürebilmekte ve hücre, solüsyonların zararlı etkilerinden korunabilmektedir. İntraselüler kriyoprotektanların hücre içine geçişleri; solüsyonun kendi geçiş gücü, hücre içi ve dışındaki kriyoprotektanların konsantrasyon farkı, ısı ve hücre yüzeyi ile orantılıdır (Leeuw ve ark., 1993; Palasz ve Mapletoft, 1996). Etilen glikol (EG) kriyoprotektanlar arasında en az toksik etkiye sahiptir. Toksisite sıralaması azdan çoğa doğru şu şekildedir (Şaylan, 2011):

- 1) EG
- 2) Metanol
- 3) DMSO
- 4) Gliserol
- 5) Propilen glikol
- 6) Bütilen glikol

**Etilen glikol;** su, alkol ve aseton ile karışabilen fakat eterde neredeyse hiç çözünmeyen, renksiz, visköz ve tatlı bir alkoldür. Bu alkolün donma noktası  $-13^{\circ}\text{C}$ , kaynama noktası ise  $198^{\circ}\text{C}$ 'dir (Aydiner, 2008). Etilen glikol yüksek geçirgenliği ve düşük sitotoksik etkisi nedeniyle insan oosit ve embriyolarının vitrifikasyonunda en çok tercih edilen kriyoprotektandır (Yoon ve ark., 2000; Yoon ve ark, 2003). Birçok tür gametlerin dondurma–çözdürme işlemi sırasında oluşan zararın etkisi, etilen glikol ve gliserolde eşit orandadır (Aydiner, 2008).

**Metanol** düşük toksik etkiye sahiptir, fakat çok yüksek konsantrasyonlarda bile vitrifiye etmediğinden dolayı vitrifikasyonda tercih edilmemektedir (Şaylan, 2011).

**Dimetil sülfoksit**, kimyasal olarak bir polar kök çevresinde iki apolar baştan oluşan amfipatik bir bileşiktir. DMSO'lar bu özelliğinden dolayı hem sıvı hem de organik medyumlarda çözünme imkanına sahiptir (Massip, 2001). Dimetil sülfoksit'in oksijeni, suyun protonları ile birleşmekte ve bunun sonucunda da ısı açığa çıkmaktadır. Geçmişte yapılan çalışmalarda DMSO'nun hücre üzerine toksik etkilerinin olduğu bildirilirken, yeni çalışmalar bunun tersini bildirmiştir (Kartberg ve ark., 2008). DMSO camsı görünüm oluşturma yeteneği, permeabilitesi ve düşük toksik etkisinden dolayı vitrifikasyon solüsyonlarında kullanılan esas komponent olmuştur. Kriyoprotektan karışımına asetamidin eklenmesi DMSO'nun toksik etkisini azaltır. Bununla birlikte, DMSO'nun kriyoprotektan karışımındaki varlığı da asetamidin zararlı etkilerini azaltır. Dekstroz proteinlere irreversibl bağlanarak DMSO'nun toksisitesini nötralize eder (Elbarbary, 2004).

**Gliserol**, yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir poliol bileşiğidir. Gliserol kendi hidroksil grubu ile sudaki oksijen arasında hidrojen bağı

şekillendirmektedir. Gliserol'ün kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması gametler üzerine olan etkisini artırmaktadır. Gliserol'ün toksik etkisi, metabolik dönüşümünde oluşan metilglioksal tarafından oluşturulur. Hücrelerde gliserolün toksisitesi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese yol açmasıyla kendini göstermektedir (Alvarenga ve ark., 2000; Gilmore ve ark., 2000; Katkov ve ark., 1998). Gliserol 1959'da Lovelock ve Bishop tarafından keşfedilen DMSO'nun koruyucu etkisine kadar kriyoprotektan olarak kullanılmıştır (Luster, 2004).

**Propilen glikol'ün** 3 M'lık konsantrasyonunda 10 dk maruz bırakılan embriyo toksik hasara uğrar. Propilen glikol vitrifikasyonda kullanılabilir, ancak son derece toksik etkilidir (Şaylan, 2011). Bazı raporlar propilen glikol'un yaklaşık % 10 konsantrasyonunun çok toksik etkili olduğunu ve vitrifikasyon için gereken konsantrasyonu düşürmek için bileşiğin çok düşük konsantrasyonlarda kullanımının yeterli olduğunu göstermiştir (Fahy ve ark., 1984).

**Bütülen glikol** vitrifikasyonda kullanılan bir kimyasaldır. Fakat embriyo kriyoprezervasyonu için son derece toksik etkili olduğundan dolayı kullanımı pek uygun değildir. Bütülen glikol konsantrasyonu 1 mol/l'yi geçmeyecek şekilde kullanılabilir (Şaylan, 2011).

Hücre dondurma medyumundaki kriyoprotektanların zararlı etkisini azaltmak için hücrelerin kriyoprotektanlara maruz kalma süresinin azaltılması ve ekstraselüler kriyoprotektanların kullanımı gibi uygulamalar yapılmaktadır (Massip, 2001). Farklı kriyoprotektanların avantaj ve dezavantajları tablo 2.4'de gösterilmiştir (Kumar Paul, 2014).



**Tablo 2.4.** Kriyoprotektanların avantajları ve dezavantajları (Kumar Paul, 2014).

<b>KP</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
DMSO	<ul style="list-style-type: none"><li>-Kolayca nüfuz edebilir.</li><li>-Buz oluşumunu azaltması ve böylece donma işlemi sırasında hücre ölümünü önler (Pegg, 2007).</li><li>-Yüksek kaynama noktası, 189°C (372°F), DMSO normal atmosferik basınçta yavaş yavaş buharlaşır.</li><li>-Anti-inflamatuvar rolleri hücresel hasarı önler.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Hücreler için yüksek konsantrasyonu ölümcüldür.</li><li>-Düşük sıcaklıkta, asil klorürlere maruz kaldığında patlayıcı reaksiyon üretir.</li><li>-Medyumdaki serumu denatüre eder.</li></ul>
EG	<ul style="list-style-type: none"><li>-Yüksek kaynama noktası ve suya olan afinitesi nedeniyle faydalı kurutucudur.</li><li>-Sıcaklığı düşürmek için kullanılır.</li><li>-Nüfuz edebilen KP'lardır.</li><li>-İç buz kristal oluşumunu önler.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Tek kullanımı hücreler için toksiktir.</li><li>-Nüfuz etme oranı yüksektir.</li><li>-Hücresel mikro organellere zarar verir.</li></ul>
Propilen Glikol	<ul style="list-style-type: none"><li>-Kolayca nüfuz edebilir.</li><li>-Non-korozif (aşındırmayan).</li><li>-Çok az buharlaşır.</li><li>-Çok düşük toksisite.</li><li>-Suyun erime noktasını düşürür.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Hücreler için yüksek konsantrasyon tehlikelidir.</li></ul>
Gliserol	<ul style="list-style-type: none"><li>-Medyumun tahriş olmasını önler.</li><li>-Yatıştırıcı etkisi ile hücrelere yardım eder.</li><li>-Buz kristalleri tarafından oluşan hasarı azaltmak için suda çözünürler.</li><li>-Sperm dondurması için işaretli olarak kullanılır.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Bir kriyoprotektan olarak kullanılması için yüksek konsantrasyonuna ihtiyaç duyulur.</li></ul>
Polivinil prolidon (PVP)	<ul style="list-style-type: none"><li>-Suda çözünürlük sağlar.</li><li>-Nispeten yüksek viskozite.</li><li>-Hücreler için daha az toksik.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Nadiren KP olarak kullanılır.</li><li>-Hücrelere zarar verir ve yüksek viskozitesi nedeniyle çözülmesi daha fazla zaman alır.</li></ul>

Ekstraselüler kriyoprotektan maddeleri moleküler ağırlıklarına göre, düşük moleküler ağırlıklı ve yüksek moleküler ağırlıklı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Hücre içine giremeyen düşük moleküler ağırlıklı kriyoprotektanlar (sakkaritler), galaktoz (180.2), glikoz (181.1), sükroz (342.3), trehaloz (378.3) ve diğer şekerleri içermektedir. Hücre içine giremeyen yüksek moleküler ağırlıklı (> 50 000 Dalton) kriyoprotektanlar (makromoleküller) ise, PVP, polivinil alkol (PVA), hidroksietil nişasta, sodyum hiyaluronat, albumin, fikol, antifriz protein (AFP) ve diğer polimerleri içermektedir (Alçolak, 2009; Palasz ve Mapletoft, 1996; Şaylan, 2011).

Ekstraselüler kriyoprotektanların rolü, donma sırasında buz oluşumunu azaltmak, soğutmadan önce hücrelerin dehidrasyonunu kolaylaştırmak ve hücrel membranı korumaktır (Begin ve ark., 2003).

Ekstraselüler kriyoprotektanların kullanımı çok faydalıdır. Çünkü oositin büzülmesini sağlayan ekstraselüler kriyoprotektanlar, hızlı soğutma ve ısıtma sırasında hücrenin içinde kristalleşebilecek su miktarını daha da düşürür (Rall, 1987) ve hücreye nüfuz eden kriyoprotektan miktarını azaltması nedeniyle olası toksik etkiyi de azaltır (Szell ve Shelton, 1987). Buna ek olarak ekstraselüler kriyoprotektanlar, ısıtma sırasında dehidre hücreye suyun hızlı bir şekilde girmesi sonucunda oluşabilecek ozmotik stresi önlemektedir (Çetin, 2004). Ekstraselüler kriyoprotektan olarak kullanılan karbonhidratlar, membranlar üzerinde dengeleyici bir etkiye de sahiptir (Crowe ve ark., 1983). Arav ve ark.'nın (1993b) yaptığı çalışmada, trehalozun sükrozdan daha az zararlı etkisinin olduğunu ifade etmişlerdir.

Papis ve ark., (2000) tarafından yapılan çalışmada, %20 Fetal Buzağı Serumı (FCS) içeren TCM-199 medyumunu ana solüsyon olarak kullanılmıştır. Vitrifikasyon işlemi için 5.5 M (%31 v/v) EG ve 1.0 M sükroz içeren vitrifikasyon solüsyonu kullanılmıştır. Deney 1'deki matür oositler EG'nin %0, %2, %4, %6'lik farklı konsantrasyonlarında 20 dk ön dengeleme işlemine tutulur, ardından %20 FCS içeren TCM medyumundaki kriyoprotekanı seyreltilmiş olan vitrifikasyon solüsyonunda dengelenerek vitrifiye edilmiştir. Deney 1, %6 EG'ye (%93.9 kontrole karşı %77.2, P<0.05) maruz kalan oositlerin düşük klivaj oranı hariç, %2, %4 veya %6'lik EG solüsyonlarında ön dengelemeye tabi tutulan oositlerde önemli bir toksik etki gözlenmemiştir. Deney 2'deki matür oositler EG'nin %0, %1, %2'lik farklı

konsantrasyonlarında 12 ile 15 dk sürelerde ön dengeleme işlemine ardından vitrifikasyon solüsyonunda 30 veya 45 sn sürelerle dengeleme işlemine tabi tutularak vitrifiye edilmiştir. Vitrifiye oositlerin blastosist aşamasına gelişme oranı, 30 saniyelik dengeleme işleminden (%0, %1 ve %2'lik EG solüsyonlarında önceden dengelenmiş oosit gruplarında blastosist aşamasına gelişme oranı sırasıyla %9.5, %13.9 ve %13.8) sonra daha yüksek olma eğilimindedir. Deney 3'deki matür oositler ise EG'nin %0, %1, %2, %3, %4, %5 ve %6'lık (v/v) farklı konsantrasyonlarında 12 ile 15 dk sürelerde ön dengeleme işlemine ardından vitrifikasyon solüsyonunda 30 sn süreyle dengeleme işlemine tabi tutularak vitrifiye edilmiştir. Kontrole göre önemli ölçüde farklı olmayan en yüksek klivaj, blastosist ve hatch blastosist oranları, %3 EG solüsyonunda önceden dengelenmiş bir grup oositte (%89, %42 ve %21 kontrole karşı sırasıyla %76, %30 ve %15) elde edilmiştir. Sağlıklı bir buzağı, %3 EG solüsyonunda önceden dengelenmiş oositlerden geliştirilen 4 morula/blastosist aşamalı embriyoların transferinden sonra, 22 Şubat 1999'da doğmuştur.

Solüsyonların potansiyel toksisitesine azaltmak için çeşitli stratejiler aşağıdaki gibi tarif edilmiştir (Mullen, 2007):

- 1) Yüksek konsantrasyonlarda toksik etkisi olan kriyoprotektanların herbiri, kombinasyon şeklinde daha düşük konsantrasyonlarda kullanımı,
- 2) Ekstraselüler kriyoprotektanlar yerine daha küçük intraselüler kriyoprotektanların kullanımı,
- 3) Hidrostatik basıncın uygulanması,
- 4) Kriyoprotektan maddelerin toksisitesini etkisiz hale getiren bileşiklerin kullanımı (örneğin, dimetil sülfoksit ile asetamid (Fahy ve ark., 1990)),
- 5) Biyomateryallerin, kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonlarına maruz kaldığı sıcaklık ve/veya zamanın azaltılması ile vitrifikasyon başarısı artırılabilir.

#### 2.1.4. Medyum Katkı Maddeleri

Kriyoprotektan solüsyonlarına sıklıkla eklenen büyük moleküler ağırlıklı bileşikler vardır. Sığır serum albümin (BSA) ve fetal sığır serumu (FBS) gibi büyük proteinler de kriyoprotektan solüsyonlarına takviye olarak eklenebilir (Kumar Paul, 2014). Ayrıca polietilen glikol, kriyoprotektan solüsyonlarına takviye olarak da eklenmiştir (Rall ve Fahy, 1985). Fetal sığır serumu veya sığır serum albüminin donma ve seyreltme ortamına eklenmesi zona pellucidayı (ZP) koruduğu bildirilmiştir. BSA veya FCS içeren medyuma dondurulmuş oositlere kıyasla, PVA içeren medyuma dondurulduktan sonra daha az sayıda oosit, fertilize olmuştur (Carroll ve ark., 1993). Proteinler surfaktan özelliklerden dolayı kullanılmıştır. Serumlar yüzey gerilimini azaltmasından dolayı hücrelerin birbirlerine, kapların duvarına veya solüsyonun yüzeyine yapışmasını önler. Proteinler, donma işlemi sırasında hücre zarlarının en az hasar görecektir şekilde stabilize eder. Biyolojik serumların, embriyo transferi yoluyla hastalık bulaştırma potansiyeli sağlayan virüsleri içerebileceği gösterilmiştir. Gama radyasyonu dahil olmak üzere serum toplanması ve işlenmesi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen, serumlardaki bazı virüslerin hala canlılığını kaybetmediği bildirilmiştir. Embriyo transfer edilen sığırlarda ortaya çıkan sığır viral diyare (BVD) enfeksiyonlu vakalarının çoğu, medyuma yerleştirilen embriyo kontaminasyonundan ziyade, dondurma ve taşıma medyumunda bulunan FCS gibi serumlardan kaynaklanmıştır. Bu yüzden kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak amacıyla serum yerine PVA, PVP ve sodyum hiyaluronat gibi maddeler kullanılmıştır (Palazs ve Mapletoft, 1996).

Arav ve ark., (1993a) farklı tipte antifriz proteinlerinin domuz oositleri üzerinde araştırarak, antifriz proteinlerinin farklı tiplerinin benzer etkilerde faydalı olabileceğini bildirmiştir. Kriyoprezervasyon çalışmalarında antifriz proteinlerinin (AFP) kullanılmasının 3 temel nedeni vardır. İlk olarak, buzun normal büyüme alışkanlığını engelleyerek 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda buz oluşumunu önleyebilmesidir. İkinci olarak, AFP'ler Knight ve ark. tarafından yapılan in vitro deneylerde ilk kez tanımlanan re-kristalizasyonu yani çözündürme sırasında oluşabilecek kristalizasyonu önleme kapasitesine sahip olmasıdır (Knight ve ark.,1984; Knight ve Duman, 1986). Üçüncü olarak, bu proteinlerin düşük sıcaklıkta

plazma membranını koruyucu özelliklerinin bulunmasıdır. Fakat AFP etkilerinin tartışmalı olduğu da ifade edilmiştir (Wang, 2000).

AFP, buz kristallerinin büyüklüğünü ve şeklini kontrol etme yetenekleri ile karakterize edilir. Tipik olarak salgılanan bu proteinler, buz büyümesini inhibe ederek ekstrasellüler buzu kontrol ederler. Bir adsorpsiyon inhibisyon mekanizması kullanmak için ortaya konulan bir hipotezde antifriz proteinleri iki ana aktiviteye sahiptir: termal histerezis ve buz rekristalizasyonu inhibisyon aktivitesidir (Lorv ve ark., 2014). Termal histerezis proteinleri (THP'ler) omurgalılar, omurgasızlar, bitkiler, bakteriler ve mantarlarda bulunurlar (Barrett, 2001). Termal histerezis aktivitesi, erime histerezisi olarak bilinen erime sıcaklığını hafifçe yükseltirken, donma histerezisi olarak da bilinen donma sıcaklığını non-koligatif azaltır. İki sıcaklık arasında, bir termal histerezis aralığı oluşur ve bir nanolitre osmometre ile ölçülür. Ortam sıcaklığı bu aralığa düştüğünde, sıvı su ve buz kristalleri, buz kristallerinin erimeye başlamadığı veya büyümediği aşırı soğutulmuş bir duruma girer. Bununla birlikte, eğer ortam sıcaklığı düşürülmüş donma sıcaklığının altına düşerse, aralığın son noktasında, buz oluşumu kontrol edilemeyen bir oranda devam eder. Belirgin patlama paternleri ile karakterize edilen bu olay, patlayıcı buz büyümesi olarak bilinir ve hücreler için fiziksel olarak zararlıdır. Ayrıca patlayıcı buz büyümesi, termal histerezis aralıklarının dışına çıkılmasından dolayı daha şiddetli hale gelen termal histerezis aktivitesi ile ilişkilidir (Lorv ve ark., 2014). THP tip III, I veya antifriz glikoprotein (AFGP) kullanıldığında, ısınma sonrası transfer edilen sığır embriyolarının hayatta kalma oranları sırasıyla %22 (2/9), %44 (4/9) ve %50 (3/6) elde edilmiştir. Fare embriyolarının MDS vitrifikasyon yöntemi ile yapılan çalışmada, yüksek konsantrasyonlarda THP (40 mg / ml) kullanımının gerekli olduğu bildirilmiştir. THP'nin çok düşük konsantrasyonlarını gerektiren membran stabilitesi üzerine faydalı etkilerinin daha önce kanıtlanmasının yanısıra yüksek konsantrasyonları kullanıldığında THP'lerin etkisi vitrifikasyon solüsyonunun stabilitesinde gösterilmiştir (Arav ve ark., 1994).

## 2.2. Sığır Oositlerinin Kriyobiyolojik Özellikleri

Primordial foliküllerdeki oositler; M II aşamasındaki bir oosite göre çok küçük olması, metabolizma hızının düşük olması, destek hücrelerinin az olması, organellerinin az olması, ZP'nin bulunmaması, periferal kortikal granüllerin olmaması, soğuğa duyarlı intrastoplazmik lipid miktarının az olması ve meydana gelecek hasarların onarılması için daha fazla zamana sahip olmaları nedeniyle kriyoprezervasyon işlemine daha uygun bulunmaktadır. Bu nedenler arasında en önemlisi, hücre boyutunun küçük olmasıdır. Çünkü hücre yüzeyinin hacme göre büyük olması kriyoprotektan ve suyun hücre zarından daha hızlı geçmesine olanak sağlamaktadır. Diğer bir önemli faktör ise primordial foliküllerin hemen hemen tüm memeli türlerinde benzer özelliklere sahip olmasıdır. Bu sayede bir türde başarı sağlanan metodun tüm türlere uygulanması mümkün olacaktır. Sonuçta bu oositler dondurmanın etkilerini daha iyi tolere edebilmektedirler (Shaw ve ark., 2000).

**Tablo 2.5.** Farklı aşamalardaki oositlerin dondurulmaya karşı özellikleri (Shaw ve ark., 2000).

<b>Materyal</b>	<b>Primordial Oosit</b>	<b>Tam Gelişmemiş Oosit (GV dönemi)</b>	<b>Tam Gelişmiş Mature Oosit (M II dönemi)</b>
<b>Bulunabilirliği</b>	Bol, daima mevcut	Nadir, yalnızca antral folliküllerden	Nadir, yalnızca siklus ortasında
<b>Toplama kolaylığı</b>	Kolay	Tekrar tekrar alınabilir	Tekrar tekrar alınabilir
<b>Boy</b>	<50 µm	80-300 µm (türe bağlı)	80-300 µm (türe bağlı)
<b>Destek hücreleri</b>	Az, çok küçük	Çok sayıda korana ve kumulus	Çok sayıda korana ve kumulus
<b>Çekirdek Durumu</b>	Profazda beklemede, çekirdek zarı var	GV, çekirdek zarı var	Soğuğa hassas iğ üzerinde M II döneminde beklemede, çekirdek zarı yok

**Tablo 2.5.** Farklı aşamalarındaki oositlerin dondurulmaya karşı özellikleri (devamı).

<b>Materyal</b>	<b>Primordial Oosit</b>	<b>Tam Gelişmemiş Oosit (GV dönemi)</b>	<b>Tam Gelişmiş Mature Oosit (M II dönemi)</b>
<b>Zona</b>	Yok	Var	Var
<b>Kortikal granüller</b>	Yok	Merkezi	Periferde
<b>Metabolik hız</b>	Yavaş	Yavaş	Yavaş
<b>Yüzey/hacim oranı</b>	Yüksek	Düşük	Düşük

### **2.2.1. Soğuğa Karşı Hücresel Duyarlılık**

Etkili bir kriyoprezervasyon protokolü geliştirmek için her hücre tipinin kriyobiyolojik özelliklerine dair temel bilgiye ihtiyaç vardır (Critser ve ark, 1997). Tek bir hücre olan oosit, çok hücreli preimplantasyon embriyosuna göre herhangi bir çevresel zorluğa karşı daha savunmasızdır (Parks ve Ruffing, 1992). Oositler, zona pellusidaya sahip özel hücreler olduklarından, hem su hem de kriyoprotektan maddeler için azaltılmış bir membran geçirgenliğine sahiptirler. Diğer hücrelerle karşılaştırıldığında oositlerin düşük yüzey alanı/hacim oranı su ve kriyoprotektanların hücre plazma membranı boyunca hareket etmesini zorlaştırır (Anchamparamthy, 2007), bu durum donma sırasında hücre içi buz oluşumu olasılığını artırır. Oositin fertilizasyona uğraması ve daha fazla gelişmesi için birçok yapısal özelliklerinin bütünlüğü korunmalıdır. Memeli oositlerinin kriyoprezervasyonu ile ilgili bir problem organellerin altındaki hücresel seviyede yatmaktadır. Organeller düşük sıcaklıklardan etkilenmektedir. Etkilenen organeller arasında plazma zarı, zona pellusida, kortikal granüller, mikrotübül iğ, mikrofilamentler ve yoğunlaştırılmış kromozomlar bulunur. Oositler soğumaya karşı oldukça hassastır ve oda sıcaklığında bile zarar görebilir. Bu problem kısmen iğ ipliği hassasiyeti ve hücrelerin yüksek lipid içeriğinden kaynaklanmaktadır. Oositlerin eşsiz olmasının nedeni, maternal Deoksiribonükleik Asit'in (DNA'nın) nükleer membranın koruyucu sınırları içinde değil, sitoplazmada asılı şekilde bulunmasıdır. DNA ve/veya mikrotübüllerin zarar görmesi, oosit kriyoprezervasyonunun sınırlı başarısını

açıklayabilir. Sığır oositleri oda sıcaklığına soğutulduğunda canlılığı önemli ölçüde azalmaktadır. Kromozomları bağlayan iğ ipliğinin parçalanması (Saunders ve Parks, 1999; Wu ve ark., 1999) ve kromatidlerin ayrılmaması, soğutma sırasında meydana gelebilir. Bu yüzden fertilizasyon sonrasında anöploidi (Sathananthan ve ark., 1987) veya poliploidi (Eroglu ve ark., 1998b) ile sonuçlanabilir ve embriyonik gelişme sonlanabilir.

Abe ve ark. (2005), vitrifiye edilen sığır oositlerinin transmisyon elektron mikroskopik çalışmasında, oosit sitoplazmasının, çok sayıda vakuol ve rüptüre membranlı mitokondri olduğunu göstermiştir ve düşük gelişim oranları ile karşılık gelmiştir. Mitokondrinin intraselüler dağılımları ve şekli, hücre döngüsünün önemli periyotlarında gerekli olan temel enerjinin üretilmesi için hücre metabolizması, proliferasyon ve farklılaşma aşaması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Matsumoto ve ark., 1998).

Kumulus oosit kompleksi (KOK), genellikle kumulus hücreleri soyulmadan kültürler, böylece oosit ve somatik hücre zarı arasındaki fizyolojik etkileşimler korunur (Downs ve ark., 2006). Dondurulduktan ve çözündürüldükten sonra oositin hayatta kalması üzerine kumulus hücrelerinin etkileri, tartışmalı olmasına rağmen faydalı etkilerin olduğu da bildirilmiştir (Im ve ark., 1997; Imoedemhe ve Sique, 1992). Imoedemhe ve Sique'ye (1992) göre, kumulus hücrelerinin mevcudiyeti, çözdürme sonrasında kriyoprotektanın dengelenmesi ve çıkarılması sürecinde kriyoprotektanın hızlı akması ve/veya akıntısı ile oluşan ozmotik değişikliklere ve streslere karşı bir miktar koruma sağlayabilir. Bununla birlikte, kumulusları soyulmaksızın kumulus oosit kompleksinin kriyoprezervasyonu sorunludur çünkü KOK'ların dengelenmesi için optimal süreler, kumulus hücreleri azaltılan oositlerden daha farklıdır. Ek olarak, hipertonic kriyoprotektan solüsyonuna daldırma, oosit ile *gap junction* bağlantısını ve granülosa hücre süreçlerini bozabilecek hücre büzülmesine neden olmaktadır. Böylece oosit ve somatik hücre zarı arasındaki fizyolojik etkileşimler korunamaz (Fuku ve ark., 1995; Gosden, 2005).

Fare oositleri soğumaya nispeten toleranslıdır (Bouquet ve ark., 1995; Carroll ve ark., 1990; Sherman ve Lin, 1959; Toner ve ark., 1991; Trounson ve Kirby, 1989). Bazı araştırmacılar, kriyoprezerve edilen fare oositlerinin IVF'inden sonra normal



embriyonik gelişimini rapor etmiştir (Carroll ve ark., 1993; Nowshari ve ark., 1994; Rayos ve ark., 1994; Schroeder ve ark., 1990; Whittingham, 1977). Buna karşılık, sığır oositleri aşırı derecede soğukta kalmaya duyarlıdır ve standart yavaş dondurma protokolleri ile kriyoprezerve edildiğinde düşük bir sağkalım görülür (Fuku ve ark., 1992; Lim ve ark., 1992; Otoi ve ark., 1992). İnsan oositleri de soğuğa duyarlıdır. Soğutma ve kriyoprezervasyon sonrasında iğ ve sitoplazmanın yanı sıra gelişimsel bozuklukta bildirilmiştir (Pickering ve ark., 1990; Sathananthan ve ark., 1988; Van Blerkom ve Davis, 1994). Kriyoprezerve edilen insan oositlerinden birkaç doğumun oluştuğu bildirilmiştir (Chen, 1986; Martino ve ark., 1996a; Van Uem ve ark., 1987).

Memeli oositlerinin ve embriyolarının soğuğa duyarlılığı benzer görünmektedir. Soğuğa duyarlılık; türlere, embriyonik aşamaya ve belirli bir sıcaklığa maruz kalma süresine bağlıdır (Nagashima ve ark., 1994; Pollard ve Leibo, 1994; Wilmut, 1986).

### **2.2.2. Dondurma ve Çözdürme Aşamalarında Karşılaşılan Hücresel Hasarlar**

Kriyoprezervasyon stratejilerinin hemen hemen hepsi, iki ana faktöre dayanmaktadır: kriyoprotektanlar ve soğutma-ısıtma oranlarıdır (Vajta ve Kuwayama, 2006). Hücresel hasarın iki ana nedeni, buz kristallerinin oluşumuyla ortaya çıkan fiziksel hasar ve intraselüler solüsyon konsantrasyonlarındaki değişikliklerden kaynaklanan kimyasal hasardır (Mandawala ve ark., 2016). Hücreler, dondurma sırasında sürekli artan hipertonic bir solüsyon ortamına maruz bırakılır. Buz oluşumu öncesinde ve kısmen sonrasında intraselüler donmayı önlemek için ozmotik olarak hücreden belirli bir miktarda suyun ayrılması gereklidir. Bu işlem, soğutma oranıyla ilgilidir. Yavaş soğutma hızlarında, hücreler dış solüsyonla dengede kalmaya çalışırlar. Ekstraselüler solüsyon, hücre membranlarının koruyucu etkilerinden dolayı intraselüler ortamdaki su önce donar. Böylece hücrenin dışı daha hipertonic hale gelir ve içten dışa su akışı (ekzosmosis) oluşur. Çok fazla suyun çıkarılması, dengelenmenin bozulması anlamına gelen solüsyon yükünde artışa yol açabilir. Soğutma hızı arttıkça, suyun hücre dışına çıkabilmesi için daha az zaman kalır. Bu yüzden artan bir şekilde süper-soğuma ve nihayetinde kaçınılmaz olarak öldürücü etkiye sahip olan intraselüler buz oluşumu başlar. Optimum bir soğutma

oranı, bu iki olayın dengesinden kaynaklanır. Optimalden daha yavaş soğutma oranlarında hücre ölümü hipertonic koşullara uzun süre maruz kalmadan kaynaklanır. Optimalden daha hızlı soğutma hızlarında hücre ölümü intraselüler buz oluşumu ile ilişkilidir. Hücreler karşılaştığı stres oluşturu durumlara verdiği potansiyel hücresel yanıtlar tablo 2.6' de gösterilmiştir (Ozkavukcu ve erdemli, 2002).

**Tablo 2.6.** Hücrelerin karşılaştığı stres oluşturu durumlarda ve hücrenin verdiği potansiyel yanıt (Ozkavukcu ve erdemli, 2002).

<b>Karşılaşılan Stres</b>	<b>Potansiyel Hücresel Yanıt</b>
Sıcaklığın azalması	Membran lipit faz değişiklikleri Hücre iskeletinin depolimerizasyonu
Solüsyon konsantrasyonunda artış	Ozmotik büzülme
İyonik konsantrasyonunda artış	Membran proteinlerinin çözünürleştirilmesi dahil olmak üzere membranlar üzerindeki doğrudan etkiler
Dehidrasyon	Lipit çift katmanlarının destabilizasyonu
Tuzların presipitasyonu (çökmesi) ve ötektik oluşumu	Bilinmiyor
Hava kabarcığı oluşumu	Membranlara ve sitoskeletona mekanik hasar
Aşırı viskoz olan solüsyon	Osmoz da dahil olmak üzere difüzyon süreçleri sınırlı olabilir
pH'taki değişiklikler	Proteinlerin denatürasyonu vb.
Hücreler yakından paketlenmiş	Membran hasarı

Sadece soğutma sırasında değil aynı zamanda soğutma öncesi süreçte, ısınma ve geri kazanım sırasında, hücreler çeşitli hasar tipleri için risk altındadır. Hücrenin hayatta kalma oranını artırmak için hücresel hasar tiplerinin tümünü atlama gerekir.

**Tablo 2.7.** Biyolojik sistemlerde hücre hasarına ve ölüme neden olan soğutma ve kriyoprezervasyonla ilişkili faktörler (Shaw ve ark.,2000).

<b>Sistem</b>	<b>Hasar tipi</b>
Genel	-İntraselüler buz oluşumu, ekstraselüler buz oluşumu, apoptozis, toksisite, kalsiyum dengesizliği, serbest radikaller, ATP düzeyleri, genel metabolizma, fertilizasyon başarısızlığı, klivaj başarısızlığı, pH, partenogenetik aktivasyon.
Membran	-Yırtılma, sızıntı, erime, mikrovilli, faz geçişi
Kromozomlar	-Azalma/artma, polispermi, poligini (polar cisim atılamaması), tertraploidi
DNA	-Apoptozis, erime, yeni düzenlemeler
Sitoskeleton	-Mikrotübüllerin çözülmesi, aktin
Proteinler/Enzimler	-Dehidrasyon, fonksiyon kaybı
Altyapı	-Mikrovilli, mitokondri, veziküller, kortikal granüller, zona pellusida hasarları
Zona pellusida	-Sertleşme, kırılma
Lipidler	-Serbest radikaller ?

Soğutma sırasında meydana gelen soğuk hasarı, oositlerin dondurulmasını sınırlayan faktörlerden birisidir. Soğuk hasarı, donmanın meydana gelmediği düşük sıcaklıklara kısa süreli maruz kalma sonrasında gelişen dönüşümsüz bir hasar olarak tanımlanmaktadır. Soğuk hasarının esas hedefi plazma membranı olduğu düşünülmektedir (Arav ve ark., 1996).

Arav ve ark. (1996), yaptığı çalışmada immatür ve matür sığır oositlerinin soğuk hasarına duyarlı olduğunu belirtmiştir. İmmatür ve matür oositlerdeki soğuk hasarının oluştuğu yerlerin farklı olduğu bildirilmiştir. İmmatür oositlerin plazma membranı, M II aşamasındaki oositlerin plazma membranından daha çok soğumaya karşı hassastır. İn vitro matüre edilen oositler, muhtemelen polispermik fertilizasyonla ilişkili olan diğer hasar (mikrotübüller ve mikrofilamentler) bölgelerini ve kromozom anormalliklerini göstermektedir.

### **2.3. İn Vitro Oosit Toplama Yöntemleri**

Aspirasyon yöntemi, folikül diseksiyon yöntemi ve ovaryum dilimleme yöntemi olmak üzere 3 farklı yöntem ile in vitro olarak oositler toplanabilmektedir (Duran 2000).

#### **2.3.1. Aspirasyon Yöntemi**

Aspirasyon yöntemi mezbahadan sağlanan ovaryum üzerinde bulunan çeşitli büyüklükteki foliküllerden uygun enjektör (5-10 ml), iğne (18 veya 21 G), vakumlu aspirasyon iğnesi gibi araçların yardımıyla oositlerin toplanmasıdır ve yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntem ile genellikle 2-8 mm çapında olan foliküller aspire edilmektedir (Çetin, 2004; Koçyiğit, 2014; Topuzoğlu, 2011).

Otomatik vakum sistemi kullanılırken 50-130 mmHg arasında aspirasyon basıncı tercih edilmektedir (Pieterse ve ark., 1991). Kaliteli oosit toplanması, iğne çapı ve aspirasyon basıncı ile ilişkilidir. Sığırlarda oosit morfolojisi ve gelişim kapasitesi üzerine aspirasyon basıncı ve iğne çapının etkisi Bols ve ark. (1996) tarafından araştırılmıştır. Araştırmacılar 18, 19 ve 21 G'lik iğneler ile birlikte 50, 70, 90, 110, 130 mmHg aspirasyon basınçlarını, oosit aspirasyon yöntemiyle denemiştir. Araştırma sonucunda en yüksek sayıda oosit, 18 G'lik iğne ve 130 mmHg aspirasyon basıncı kullanılarak elde edilmiştir.

Aspirasyon yönteminin dezavantajı foliküllerin sadece %30-60'ından oosit elde edilebilmesidir. Bu yüzden ovaryum dilimleme yöntemi ile beraber oosit toplanması daha faydalı olur (Duran, 2000). Ayrıca aspirasyon yöntemi ile toplanan oositlerin yaklaşık olarak %43'ü morfolojik açıdan normal bulunmaktadır. Bu yöntemde ovaryum başına elde edilen kullanılabilir kalitedeki oosit sayısı 5-8 adet olduğu belirtilmiştir. Aspirasyon yönteminin pratik olması ve çok sayıda ovaryumun işlenebilmesine imkan sağlamasından dolayı dezavantajlarına rağmen tercih edilmektedir. Yapılan araştırmalarda çok sayıda ovaryumun işlenmesinin önemli olduğu durumlarda aspirasyon yöntemi önerilirken, oosit kalitesinin önemli olduğu durumlarda ise diseksiyon yöntemi önerilmektedir (Çetin, 2004; Gordon, 2003; Koçyiğit, 2014).

Aspirasyon yönteminde elde edilen oosit sayısının artırılmasına yönelik transillüminasyon aspirasyon tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntemde, ovaryumun medulla ve korteksine ışık kaynağı yerleştirilip kortikal foliküllerin görüntülenmesi sağlanarak ovaryum başına elde edilen oosit sayısının %50 oranında artırılacağı bildirilmiştir (Arav, 2001).

### **2.3.2. Folikül Diseksiyon Yöntemi**

Veziküler foliküllerin diseksiyonundan sonra, ovaryumların parçalanarak oositin toplanması işlemidir ve öncelikle koyunlarda kullanılmıştır. Bu yöntemin amacı, oositi çevreleyen kumulus hücrelerine zarar vermeden oositin toplanmasıdır. Kumulus oosit kompleksi folikül duvarına sıkıca bağlandığı için aspirasyon yöntemiyle toplanması mümkün olmayan kaliteli oositlere, diseksiyon yöntemiyle daha yüksek oranda ulaşılabilmektedir. Atretik ve atretik olmayan foliküllerin belirlenmesi, bu yöntemin en büyük avantajıdır. Atretik foliküllerde donuk gri renkli ve zayıf damarlaşma görülürken, atretik olmayan foliküllerde homojen bir şekilde saydam veya açık renkli, iyi bir damarlaşma görülür (Çetin, 2004; Gordon, 2003; Koçyiğit, 2014; Topuzoğlu, 2011).

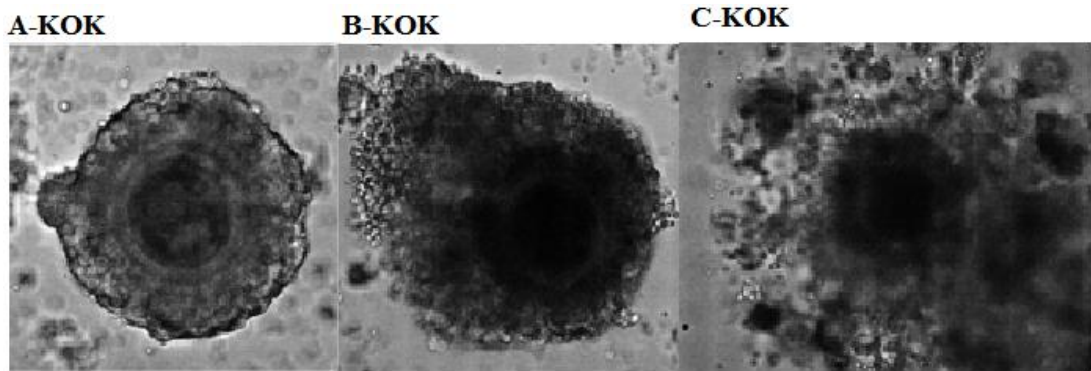
### **2.3.3. Ovaryum Dilimleme Yöntemi**

Foliküllerden geçecek şekilde ovaryum üzerinde bistüriyle çeşitli şekillerde kesitler atılarak yapılan bir yöntemdir. Ovaryum dilimleme yöntemi, tek başına kullanıldığı gibi aspirasyon yöntemiyle birlikte de kullanılabilir. Bu yöntemle ovaryum başına 20-50 arasında oosit elde etmek mümkündür (Duran, 2000). Folikül aspirasyon ve ovaryum dilimleme yöntemiyle birlikte kullanıldığında ovaryum başına 9.2-20.3 arasında değişen miktarda iyi kaliteli oosit elde edilebileceği belirtilmiştir (Gordon, 2003; Koçyiğit, 2014). Özellikle koyun, keçi gibi küçük ovaryumlu hayvanlarda kullanılır. Bu yöntemle çok sayıda oosit elde edilmekle birlikte, mayotik olarak yetersiz oositlerin de toplanabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte ovaryumun işlenmesi çok zaman alacağından dolayı az sayıda ovaryumla çalışılacak durumlar için önerilmiştir (Çetin, 2004; Duran, 2000; Koçyiğit, 2014; Topuzoğlu, 2011).

## 2.4. Kriyoprezervasyon İçin Uygun Oositlerin Seçilmesi

Ün ve Küplülü'nün (2005) yaptığı çalışmada ovaryum üzerindeki periferal foliküller kompas yardımıyla ölçülerek büyüklüklerine göre 2-7 mm'lik (Grup I) ve 7-10 mm'lik (Grup II) olarak iki gruba ayrılmıştır. Bu foliküllerden alınan oositler IVM'e tabi tutulmuştur. IVM sonucunda Grup I'deki maturasyon başarı yüzdesi %69,44 ve maturasyon bozukluk yüzdesi %8 iken Grup II'deki maturasyon başarı yüzdesi %74,2 ve maturasyon bozukluk yüzdesi %5,1 olarak bildirilmektedir (Ün ve Küplülü, 2005).

Toplanan foliküler sıvının tortusundaki KOK'ların ayrılması sırasında, KOK'larının kalite derecesi Wurth ve Kruip'e göre şu şekilde anlatılmıştır: İmmatür sığır KOK'lar morfolojik kriterler temelinde üç kategoriye ayrılır. A-KOK, en az üç hücre tabakaları ile tamamen oositi çevreleyen açık ve kompakt bir kumulusu göstermektedir; oosit yarı saydam ve homojen bir ooplazmaya sahiptir. B-KOK, en az üç hücre tabakaları ile tamamen oositi çevreleyen koyu ve kompakt kumulusu göstermektedir; oosit koyu ve homojen olmayan ooplazmaya sahiptir ve koyu bir korona radiata ile çevrilidir. C-KOK'lar düzensiz yayılmış kümelenmiş olan kumulus, bir jöle matriks içindeki hücrelerin dejenere olduğunu tam olarak göstermektedir; oosit homojen olmayan bir ooplazma ile koyudur. Farklı kalitelere sahip immatür sığır KOK'ların görünümü şekil 2.4'de gösterilmiştir (Boni ve ark., 2002).



**Şekil 2.4.** Farklı kalitelere sahip immatür sığır KOK'larının görünümü. A-KOK, açık ve kompakt bir kumulus ve saydam ooplazma varlığı sergiler; B-KOK, koyu ve kompakt kumulus ve koyu ooplazma sergiler ve C-KOK, koyu ve yayılmış kumulus ve koyu ooplazma sergiler (Boni ve ark., 2002).

## 2.5. Oositlerin Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Oosit kriyoprezervasyonu, oositlerin özel koruyucu maddelerle (kriyoprotektanlar) ve kriyojen sıvılarla ( $-196^{\circ}\text{C}$ 'lik sıvı azot veya  $-269^{\circ}\text{C}$ 'lik sıvı helyum) dondurularak sıvı azot tanklarında saklanmasıdır (Mandawala ve ark., 2016; Yu ve ark., 2016; Wu ve ark., 2017b). Kriyoprezervasyon, hücrenin metabolik faaliyetlerinin hızını azaltarak uzun süre saklanmasını sağlar. Ancak, dondurulan hücrelerde hasar meydana gelir ve bu durumu en aza indirmek gerekir (Mandawala ve ark., 2016).

Kriyoprezervasyonun etkinliği, bir dizi değişken faktörleri içerir. Bu faktörler;

- 1) Hücrelerin çeşitli konsantrasyonlarda kriyoprotektanlara maruz kalması,
- 2) Hücrelerin  $0^{\circ}\text{C}$ 'nin altındaki sıcaklıklara soğutma hızı,
- 3) Hücrelerin  $-130^{\circ}\text{C}$ 'nin altındaki sıcaklıklarda saklanması,
- 4) Hücrelerin çözündürülmesi,
- 5) Kriyoprotektanın seyreltilmesi, uzaklaştırılması ve hücrelerin rehidrasyonudur (Anchamparuthy, 2007; Leibo, 1986; Leibo ve Songsasen, 2002).

Oosit dondurmada kullanılan yöntemler dört ana başlık altında incelenmektedir. Bunlar; yavaş dondurma, ultra hızlı dondurma, vitrifikasyon ve yavaş dondurma veya vitrifikasyon sonrası oositlerin kurutulması yöntemleridir. Bu yöntemlerin birbirlerine karşı avantaj ve dezavantajları olmakla birlikte, oosit dondurma söz konusu olduğunda vitrifikasyon, öne çıkan bir yöntemdir (Arav, 2014; Çetin, 2004).

### 2.5.1. Yavaş Dondurma Yöntemleri

Yavaş dondurma yöntemi, kriyoprotektan solüsyonlardaki hücrelerin kısa bir ön dengelemesini, ardından dondurularak korunan hücrelerin türü için optimize edilmiş hızlarda kontrollü, kademeli, yavaş soğutmayı içerir. Bu yöntem özel

programlanabilir hücre dondurma ekipmanı kullanılarak gerçekleştirilir ve tamamlanması için gerekli süre 3-6 saattir (Rama Raju ve ark., 2006).

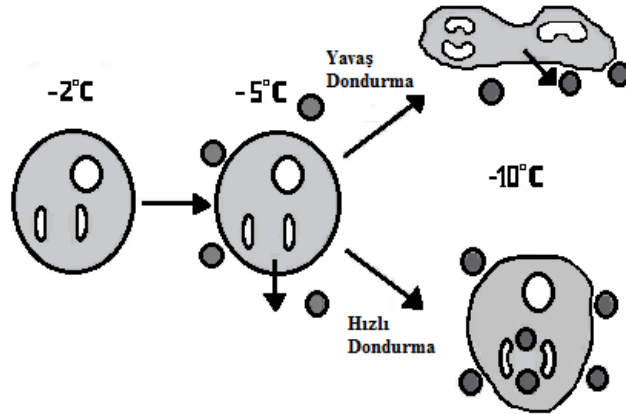
Çok sayıda modifikasyonu bulunan yavaş dondurma yöntemi, şu basamakları içermektedir (Çetin, 2004; Shaw ve ark., 2000; Şaylan, 2011);

- 1) Kriyoprotektanın eklenmesi,
- 2) Dondurma gerecinin içine hücrelerin yerleştirilmesi,
- 3) Gereçlerin dondurma makinesine alınması,
- 4) Kristalizasyonun uyarılması (seeding),
- 5) Yavaş soğutma,
- 6) Sıvı azot içinde saklama,
- 7) Örneklerin çözülmesi ve kriyoprotektanın uzaklaştırılmasıdır.

Hücrelerin sıcaklığı, soğutularak düşürülür ve seeding denilen bir işlemle ekstraselüler solüsyon içinde buz oluşumu uyarılarak başlatılır (Rama Raju ve ark., 2006). Seeding, dondurma makinesinde 0°C'nin altında, genellikle -5 ile -9°C arasındaki sıcaklıklarda kontrollü olarak buz oluşumunun uyarılmasıdır. Seeding işlemi gerçekleştirildiğinde plazma membranının buzdan koruyucu etkisi sayesinde ilk olarak ekstraselüler ortam donmaya başlar (Shaw ve ark., 2000). Buz kristallerinin boyutu arttıkça ekstraselüler su, sıvı halinden katı hale dönüşür. Bu durum, ekstraselüler ortamdaki solüsyonun konsantrasyonunu artırır ve hücre içindeki suyu ekstraselüler ortama geçmesini sağlar. Sonuç olarak hücre, intraselüler solüsyon konsantrasyonunda meydana gelen artış nedeniyle dehidre olur. Bu artan intraselüler solüsyon konsantrasyonu, hücrenin donma noktasını yaklaşık -35 °C'ye düşürür. Hücre bu donma noktasındayken neredeyse susuz olduğu için dondurulduğunda oluşabilecek buz kristali göz ardı edilebilir (Rama Raju ve ark., 2006). Fare oositlerinde yapılan çalışmalar, intraselüler buz kristallerinin oluşmaması için intraselüler suyun %90'ının kaybedilmesi gerektiğini göstermektedir. Halbuki embriyolarda bu oran, %30 olması yeterli olmaktadır (Çetin, 2004).



Suyun hücreden ayrılma hızı, soğutma oranına bağlıdır. Hücreler hızlı bir şekilde soğutulduğunda, hücre içinde mevcut olan su, yeterince hızlı hareket edemeyeceğinden dolayı hücre için ölümcül olan intraselüler buz kristallerinin oluşumuna neden olur. Hücreler çok yavaş soğutulursa, hücre membranlarının lipid protein kompleksleri üzerine zararlı etkileri olan yüksek intraselüler solüsyon konsantrasyonundan dolayı hücreler ciddi şekilde büzülür. Bununla birlikte yavaşça soğutulan hücreler, potansiyel olarak donma hasarından etkilenir. Bu nedenle, kriyoprezervasyon sırasında hücresel hasar ile ilgili iki ana durum olan, intraselüler buz kristalizasyonu ve yüksek solüsyon konsantrasyonunu önlemek için protokolde kullanılan soğutma ve kriyoprotektan konsantrasyon oranı optimize edilmelidir. İntraselüler buz oluşumu üzerine soğutma oranının etkisi şekil 2.5’de gösterilmiştir (Rama Raju ve ark., 2006).



**Şekil 2.5.** İntraselüler buz oluşumu üzerine soğutma oranının etkisi (Rama Raju ve ark., 2006).

Yavaş dondurma başarısı, suyun hücreden ayrılma oranı ile buza dönüştürülmeden önceki soğutma oranı arasındaki optimal dengenin sağlanmasına bağlıdır. Bu nedenle, bu dengeyi sağlayarak insan oositleri ve embriolarının yavaş dondurma prosedürlerini gerçekleştirmek için ihtiyaç duyulan süre, en az 90 dakikadır. Yavaş dondurma protokolünün gerçekleşmesi için gerekli olan uzun sürenin yanı sıra, pahalı, programlanabilir dondurma ekipmanı gerektirir. Bu dezavantajlara ek olarak yavaş dondurma protokolleri; in vitro üretilen sığır

embriyoları, domuz embriyoları, insan M II oositleri ve blastosistleri gibi donma hasarına duyarlı çeşitli tipteki hücrelerin dondurulmasında yeterli değildir (Rama Raju ve ark., 2006).

Memeli oositlerinde yapılan yavaş dondurma yönteminde; numuneler, fizyolojik bir solüsyonda çözdürülen 1-2 mol/l kriyoprotektan solüsyonları içinde süspanse edilir, buz oluşumu uyarılır ve çok yavaş bir şekilde soğutulur (0.3-0.5 °C/dk). Böylece hücre içeriği, ekstraselüler buz gelişimi sırasında ekstraselüler donmamış bölümün konsantrasyonuna cevap olarak, kademeli dehidrasyonu ile konsantre hale gelir. Whittingham tarafından 1972’de geliştirilen orijinal yavaş dondurma işleminde numune sıvı azot içinde saklanmadan önce -80°C’ye soğutulmuştur. Eğer numuneler hızlı bir şekilde çözdürülecekse, numunenin sıvı azota daldırılmasından önce yavaş soğutmanın yaklaşık -30 C’de sonlandırılabilceği bildirilmiştir. Yavaş dondurma aşamaları, intraselüler buz oluşumunu önlemek için gereklidir. Yavaş dondurma yöntemi çeşitli memeli türlerinin oositleri/embriyoları için etkili olmuştur. Yavaş dondurma yöntemi memeli oosit ve embriyolarının kriyoprezervasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, soğutma oranını kontrol etmek için özel bir cihaz ve soğutma için uzun bir zaman gerekmektedir (Kumar, 2007).

Mezbahadan elde edilen ovaryumların foliküllerinden aspire edilen oositler, maturasyonun GV aşamasındadır. Oosit bu aşamada ilk mayoz bölünmenin erken profaz aşamasında olduğundan genetik materyal nükleusun içinde yer alır ve herhangi bir iğ ipçığı yoktur. Nükleus membranının varlığından dolayı, bu tip oositler kriyoprezervasyon sırasında hasarlara daha az eğilimli olabileceği düşünülmüştür, fakat immatür GV aşamasındaki sığır oositlerinin kriyoprezervasyonu ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır (Kumar, 2007).

Suzuki ve ark. (1996b), sığır oositlerinin çözdürme sonrası gelişimsel yeterliliği üzerine çeşitli kriyoprotektanların [1.8 M EG, 1.3 M Etilen Glikol Monometil Eter (EME) ve 1.6 M PROH] trehaloz ve PVP’nin farklı konsantrasyonlarındaki etkisini karşılaştırmıştır. GV aşamasındaki sığır oositleri 1.8 M EG, %5 PVP ve 0.05 trehaloz karışımı içinde yavaşça dondurulduğunda, oositlerin yaklaşık %80’i M II’ ye gelişmiştir, %22’si IVM sonrası dejenere olmuştur

ve dondurulmuş oositlerin hiçbiri partenogenetik aktivasyona maruz kalmamışlardır. EG, EME ve PROH kullanılan gruplardaki fertilizasyon sonrası gelişimde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Im ve ark.'nın (1997) yaptığı çalışmada immatür sığır oositlerinin kriyoprezervasyonu için PROH ve DMSO' nun etkinliği kıyaslanmıştır ve sırasıyla %38 ve %30 nükleer maturasyon oranları elde edilmiştir. Oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin varlığı dondurulup çözödürölen immatür sığır oositlerinin IVM'i için önemlidir. Dondurulup-çözödürölen oositler kullanıldığında, KOK'larının maturasyon oranı denödüe edilen oositlerin maturasyon oranına göre önemli ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir (Im ve ark.,1997).

Maturasyonun M II aşamasındaki oositler, kriyoprezerve edilebilir. Bu aşamada, kromozomlar metafaz plakasında düzenlenir ve nükleusun membranı yoktur. Oositi çevreleyen kumulus kitlesi ekspansive olur ve hücre bağlantısı hiyaluranik asit ile sağlanır (Kumar, 2007) .

PROH, in vitro matüre edilmiş sığır oositlerinin yavaş dondurulmasında bir kriyoprotektan olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Otoi ve ark., 1994; Otoi ve ark., 1997). Xu ve Betteridge' in (1992) yaptığı çalışmada in vitro matüre edilen oositleri 1.5 M PROH kullanarak yavaş dondurma yöntemiyle kriyoprezerve etmiştir. Dondurulup-çözödürölen oositlerin %67.4'ünün, hayatta kaldığını gösteren normal görönlü sitoplazmaya ve hasar görmemiş zona pellusidaya sahip olduğu bildirilmiştir. Fertilizasyon ve klivaj oranları sırasıyla %22.2 ve %7.9 olarak elde edilmiştir. PROH' un 1.5 M konsatrasyonunda kriyoprezerve edilen sığır oositlerinin çoğu (%86) morfolojik olarak normal bir şekilde elde edilmesine rağmen, düşük fertilizasyon (%36.4) ve klivaj (%13.5) oranlarının gösterdiği gibi oositlerin gelişimsel yeteneklerinin ciddi şekilde engellendiği Sun ve ark. (1995) tarafından bildirilmiştir. Mavrides ve Morroll'un (2002) yaptığı çalışmada, in vitro matüre edilen sığır oositlerinin yavaş dondurulması için 1.5 M PROH kullandığında, çözödürme sonrası %54.4 oranında morfolojik olarak normal oositler elde etmiştir. IVF sonrası klivaj oranı yaklaşık %15 bulunmuştur.

İn vitro matüre edilen sığır oositlerinin yavaş dondurulması için farklı kriyoprotektanların etkinliğini karşılaştırmak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Önceki çalışmalardan birinde Otoi ve ark. (1993), in vitro matüre edilen sığır

oositlerinin yavaş dondurulması için kriyoprotektanlardan 1.6 M PROH, DMSO ve gliserolün izo-molar konsantrasyonlarının etkinliğini karşılaştırmıştır. Dondurulup-çözdürülen morfolojik olarak normal olan oositlerin İVF'i sonrasında, PROH grubunun fertilizasyon oranı (%57.9), DMSO (%38.3) grubuna göre daha yüksek bulunurken, gliserol (%50.9) grubuyla benzer bulunmuştur. Bununla birlikte PROH, gliserol ve DMSO grupları için, klivaj (sırasıyla %22.4, %20.6 ve %18.3) ve blastosist (sırasıyla %1.4, %4.8 ve %0.9) aşamasına kadar gelişen oosit oranları arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

Lim ve ark. (1999), M II aşamasındaki in vitro matüre edilmiş sığır oositlerini, 1 M gliserol, 1 M DMSO veya 1 M PROH içeren fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) içinde yavaş dondurma yöntemiyle kriyoprezerve etmiştir. Oositler hızlı bir şekilde çözdürüldüğünde, DMSO (%86) ve PROH (%83) gruplarındaki morfolojik olarak normal oosit sayısı gliserol (%62) grubuna göre daha fazla elde edilmiştir ( $P<0.05$ ). Oositler, dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermatozoaları ile in vitro olarak fertilize edildiğinde, DMSO (%79) ve PROH (%76) gruplarındaki penetrasyon oranları gliserol (%48) grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir ( $P<0.05$ ). Fertilizasyondan 48 saat sonrasında 2-hücreli aşamaya gelişen oositlerin yüzdesi DMSO (%51) ve PROH (%54) gruplarında gliserol (%33) grubuna göre önemli derece yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Bununla birlikte, PROH (%46 ve %14) ile dondurulan oositlerin fertilizasyonundan 72 saat sonrasında 8-hücreli embriyo ve morula oranları, DMSO (%21 ve %6) ve gliserole (%26 ve %8) göre önemli derece yüksek olduğu gözlemlenmiştir ( $P<0.05$ ). Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar, kullanılan kriyoprotektan türünün metafaz II aşamasında dondurulmuş sığır oositlerinin gelişimsel yeterliliğini etkileyen önemli faktörlerden biri olduğunu bildirmiştir. Yavaş dondurma yöntemiyle dondurulan metafaz II aşamasındaki oositlerinden çok sayıda 8-hücreli embriyo ve morula gelişiminde PROH, hem gliserol hem de DMSO'dan çok daha etkilidir (Lim ve ark., 1999). İm ve ark. (1997), yaptığı çalışmada 1.5 M PROH (%67) ve 1.5 M DMSO (%61) ile dondurulan oositlerin nükleer maturasyon oranlarının benzer olduğunu rapor edilmiştir.

Kumar'ın (2007) bildirdiğine göre, fertilize edilen ve edilmeyen memeli oositlerin kriyoprezervasyonundan sonra hayatta kalma oranlarını karşılaştıran Smith, fertilize oositlerin fertilize edilmemiş oositlere göre daha iyi gelişme şansına sahip olduğunu bildirmiştir. Oositler ve embriyolar arasındaki bu fark oosit kriyoprezervasyon araştırmalarının ilk günlerinde fark edilmesine rağmen, ilk memeli oosit kriyoprezervasyon protokolleri, embriyo kriyoprezervasyonunda kullanılan "yavaş dondurma" yöntemindeki dengeleme işlemine göre taklit edilmiştir (Fabbri ve ark. 2000; Paynter, 2000; Rall, 1992).

Canlı doğumlar; fareler (Whittingham, 1977), tavşanlar (Al-Hasani ve ark., 1989), sığırlar (Fuku ve ark., 1992; Otoi ve ark., 1992) ve insanlar (Chen, 1986) dahil olmak üzere çeşitli türlerde benzer yavaş dondurma yöntemleri kullanılarak rapor edilmiştir. Oosit kriyoprezervasyonu sonrasında meydana gelen doğumlar tablo 2.8'te listelenmiştir (Kumar, 2007).

**Tablo 2.8.** Memeli oositlerin başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu sonrasında meydana gelen ilk doğumlar (Kumar, 2007).

<b>Türler</b>	<b>Yöntem</b>	<b>Kaynaklar</b>
Fare	Yavaş dondurma	Parkening ve ark. (1976)
	Vitrifikasyon	Kono ve ark. (1991)
Tavşan	Yavaş dondurma	Al-Hasani ve ark. (1989)
	Vitrifikasyon	Vincent ve ark. (1989)
Sığır	Yavaş dondurma	Fuku ve ark. (1992)
	Vitrifikasyon	Vajta ve ark. (1998)
İnsan	Yavaş dondurma	Chen (1986)
	Vitrifikasyon	Kuleshova ve ark. (1999)
At	Vitrifikasyon	Maclellan ve ark. (2002)

### 2.5.2. Hızlı Dondurma Yöntemleri

Hızlı dondurma,  $-1250^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ 'lık hızlı soğutma oranlarının uygulanmasından önce kısmen dehidre edilmiş hücrelerin kriyoprezervasyonudur. Embriyoların başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu için gerekli olan solüsyon, gliserol,

propandiol, DMSO veya etilen glikol gibi intraselüler kriyoprotektanların 2 ile 4.5 M'lık ve sükröz, trehaloz, laktoz ve galaktoz gibi ekstraselüler kriyoprotektanların 0.25 ile 0.5 M'lık solüsyonlardan oluşan kriyoprotektanların karışımıdır. Kısa bir dengeleme süresinden (30 sn ile 3 dk) sonra kısmen dehidre olan embriyolar, sıvı nitrojen buharında ara sıcaklıklarda soğutulmasının ardından sıvı nitrojen içine daldırılır. Vitrifikasyonun tersine, hızlı dondurma sırasında ekstraselüler su donar ve donma solüsyonunun ozmolaritesi artar ve böylece intraselülerde bulunan dondurulabilecek su miktarı azalır. Ancak bu koşullar altında intraselüler buz oluşumu mümkündür ve çözürme sırasında uygun olmayan ısınma oranları, embriyo hasarına neden olabilir. Hızlı dondurma yöntemi ile kriyoprezerve edilen sığır embriyolarının hayatta kalma oranları (%33.3), yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemlerine göre daha düşüktür (Palasz ve Mapletoft, 1996). Bu yüzden hızlı dondurma yöntemi pek tercih edilmemektedir.

### **2.5.3. Vitrifikasyon**

Vitrifikasyon; bir sıvının donmadan soğuma nedeni ile yoğunluğunun çok yükselmesi sonucunda cam benzeri bir hal alması olarak tanımlanmaktadır (Özatic 2011).

Vitrifikasyonun etkinliği bir dizi değişken faktörleri içerir. Bu faktörler;

- 1) Kriyoprotektan çeşidi ve konsantrasyonları,
- 2) Vitrifikasyon solüsyonunun sıcaklığına maruz kalma,
- 3) LN<sub>2</sub>'ye daldırılmadan önce hücrelerin/dokuların, son kriyoprotektana maruz bırakılan sürenin uzunluğu,
- 4) Hücreleri/dokuyu çevreleyen kriyoprotektan solüsyonunun hacmindeki değişkenlik,
- 5) Kullanılan gereçler,
- 6) Test edilen hücrelerin/dokunun kalitesi ve gelişim aşaması,

7) Biyolojik materyali içeren vitrifikasyon solüsyonu ve LN<sub>2</sub>'nin doğrudan teması, bir kontaminasyon kaynağı olabilir. Bu tehlikeyi ortadan kaldırmak için, soğutma ve depolama için steril LN<sub>2</sub> kullanılması zorunludur (Anchamparuthy, 2007).

Vitrifikasyon, kriyoprezervasyon için alternatif bir yöntemdir. Vitrifikasyon, buz oluşumunu önleyen hızlı soğutma ile konsantre solüsyonların kullanımını birleştiren bir işlemdir. Numuneler, düşük sıcaklıklarda viskoz bir sıvının moleküler yapısına sahip camsı bir hale dönüşür. Vitrifikasyon, hücre içi ve hücre dışı boşlukta buz kristallerinin oluşmasını önler (Rall and Fahy, 1985). Vitrifikasyon, ultra hızlı soğutma hızlarını (2.000-25.000°C/dak) ve kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonlarının (5-7 M) kullanımını içerir. Rall (1987) teorik olarak suyun bile 107°C/sn'lik bir soğutma hızı kullanılarak vitrifiye edilebileceğini belirtmiştir. Hücreler, kriyoprezervasyon öncesi solüsyon viskozitesini arttıran kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonlarına maruz bırakılması ile dehidre olur. Hücreler kriyoprotektan içinde süspanse edilir, daha sonra sıvı azot içine direk olarak daldırılır ve hücreler cam benzeri bir hal alır. Bu teknik, hücre içi buz oluşumunu tamamen ortadan kaldırır. Bununla birlikte hücreler, kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında hasar görebilir. Buna karşılık, vitrifikasyon programlanabilir dondurma ekipmanı ihtiyacını ortadan kaldırdığı için düşük maliyetli olma avantajına sahiptir ve yavaş soğutmaya kıyasla daha hızlı ve daha kolay bir şekilde yapılır (Kumar, 2007).

Embriyoların vitrifikasyon prosedürü ilk olarak Rall ve Fahy (1985) tarafından tarif edilmiştir. Araştırmacılar, fare embriyolarının kriyoprotektanların konsantre solüsyonlarında süspanse edilmesi ve hızla, sıvı azot içerisinde soğutulmasıyla başarılı bir şekilde kriyopreserve edilebileceğini göstermiştir. Vitrifiye edilmiş fare embriyolardan normal yavrunun geliştiği bildirilmiştir (Rall, 1987). Birçok araştırmada, geleneksel yavaş dondurmadan ziyade vitrifikasyonun memeli oositlerinin kriyoprezervasyonu için daha iyi bir yöntem olabileceğini ileri sürüldüğünden beri bu prosedür, oosit kriyoprezervasyonuna alternatif bir yöntem olarak gittikçe artan bir önem kazanmıştır (Kumar, 2007). Vitrifikasyon; fare (Chen ve ark., 2000; Lane ve Gardner, 2001), rat (Nakagata, 1992), keçi (Begin ve ark.,

2003), at (MacLellan ve ark., 2002), insan (Kuleshova ve ark., 1999; Liebermann ve Tucker, 2002; Yoon ve ark., 2000) ve sığır (Le Gal ve ark., 2000; Matsumoto ve ark., 2001; Mavrides ve Morroll, 2002; Papis ve ark., 2000; Vieira ve ark., 2002) oositlerinin kriyoprezervasyonu için kullanılmıştır. Bunun dışında sığır blastosistleri, vitrifiye edilen sitoplastların veya oositlerin içindeki erişkin fibroblastlardaki çekirdeklerin aktarılmasıyla üretilmiştir (Booth ve ark., 1999).

İmmatür sığır oositleri %40 EG, 0.3 M trehaloz ve %20 PVP içeren Dulbecco'nun fosfat tamponlu tuz solüsyonu (DPBS) negatif (-), pozitif (+) ve sodyum klorürden (NaCl) oluşan bir vitrifikasyon çözeltisi ile vitrifiye edildiğinde, IVF sonrasında klivaj oranları sırasıyla %23, %21 ve %13, blastosist oluşumu sırasıyla %3, %3 ve %1 bulunmuştur (Saha ve ark., 1996). İki kriyoprotektan (%25 gliserol ve %25 EG) karışımında vitrifiye edilen immatür sığır oositlerinin fertilizasyon sonrası klivaj oranı %16 olmasına rağmen, elde edilen 146 oositin hiçbirinin blastosist aşamasına gelişmediği rapor edilmiştir (Le Gal ve Massip, 1999).

İn vitro matüre edilmiş sığır oositlerinin vitrifikasyonu ile ilgili yapılan ilk çalışmalardan biri, Hamano ve ark. (1992), 2 M DMSO, 1 M asetamid ve 3 M PROH karışımında oositleri vitrifiye etmesidir. Dondurulup çözülürken oositlerin IVF ve IVC sonrasında, fertilize edilen 88 oositin 9'u blastosist aşamasına gelişmiş ve 3 blastosistin 3 alıcıya transfer edilmesiyle 2 gebelik elde edilmiştir. Saha ve ark. (1996), in vitro matüre ettikleri oositleri, Dulbecco'nun fosfat tamponlu tuz solüsyonu (DPBS) negatif (-), pozitif (+) ve NaCl içinde %40 EG, 0.3 M trehaloz ve %20 PVP içeren bir vitrifikasyon solüsyonu ile vitrifiye etmiştir. IVF'den sonra, klivaj oranları sırasıyla %27, %18 ve %14, blastosist oranı sırasıyla %3, %4 ve %3 bulunmuştur. Le Gal ve Massip (1999), %25 gliserol ve %25 EG karışımı içinde in vitro matüre sığır oositlerini vitrifiye etmiştir. Fertilizasyon sonrası klivaj oranı, %22 elde edilmesine rağmen, alınan 99 oositin hiçbirisi blastosist aşamasına gelişmemiştir.

Otoi ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada, 1. deney grubunda matür sığır oositlerinin 0.35 M sükröz ve %30 EG içeren vitrifikasyon solüsyonuna aşamalı olarak maruz bırakılmasının (1 adımlı grupta 1. damla %30 EG 1 dk; 2 adımlı grupta 1. damlada %15 EG 1 dk, 2. damlada %30 EG 1 dk; 3 adımlı grupta 1. damlada %10



EG 1 dk, 2. damlada %20 EG 1 dk, 3. damlada %30 EG 1 dk) etkilerini incelemiştir. Bu deney grubunun sonucunda, 3 adımlı vitrifikasyon grubundaki oositlerin morfolojik olarak hayatta kalma ve bölünme oranları, 1 ve 2 adımlı gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada, araştırmacılar 2. deney grubunda 3 adımlı vitrifikasyonu ve %20, %30, %40, %50'lik farklı oranlarda EG kullanarak 4 farklı gruptaki (1. grupta 1. damla %6.7 EG, 2. damla %13,3 EG, 3. damla %20 EG; 2. grupta 1. damla %10 EG, 2. damla %20 EG, 3. damla %30 EG; 3. grupta 1. damla %13.3 EG, 2. damla %26.7 EG, 3. damla %40 EG; 4. grupta 1. damla %16.7 EG, 2. damla %33.3 EG, 3. damla %50 EG) oositlerin hayatta kalma oranlarını ve blastosist gelişim oranlarını incelemiştir. Bu ikinci deneyin sonucunda araştırmacılar, %40 ve %50 EG gruplarındaki oositlerin hayatta kalma oranları, %20 ve %30 EG gruplarına göre daha yüksek bulurken, %40 EG grubundaki blastosist gelişim oranı diğer gruplara göre daha yüksek bulmuştur. Aynı çalışmada araştırmacılar 3. deney grubunda 3 adımlı vitrifikasyon, %40 EG kullanarak ilk adımdaki 0.5 M sükrözün 1 dk, 5 dk, 10 dk'lık farklı sürelerde (1. grupta 1. damla 0.5 M sükröz 1 dk, 2. damla 0.33 M sükröz 1 dk, 3. damla 0.17 M sükröz 1 dk; 2. grupta 1. damla 0.5 M sükröz 5 dk, 2. damla 0.33 M sükröz 1 dk, 3. damla 0.17 M sükröz 1 dk; 3. grupta 1. damla 0.5 M sükröz 10 dk, 2. damla 0.33 M sükröz 1 dk, 3. damla 0.17 M sükröz 1 dk) maruz bırakılmasının etkilerini incelemiştir. Bu 3. deneyin sonucunda 3 adımlı, %40 EG'de vitrifiye edilen oositler üç grupta da oositlerin gelişim oranları benzer bulunmuştur. Fakat 2. Gruptaki (0.5 M sükröz da 5 dk) oositlerin blastosist oranı (%10) diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur.

Süper soğutma sağlamak için sadece hacim önemli değildir. Luyet tarafından belirtildiği gibi aşırı soğutulmuş veya doymuş solüsyonların konsantrasyonu ve soğutma hızı kristalizasyonun uyarılmasında etkisi olabilecek diğer faktörlerin arasındadır. Soğutmanın hızı, numunenin ısı kütesine ve yüzey alanına bağlıdır. Hızlı bir soğutma elde etmek için, hacim oranına göre maksimum yüzey ve en düşük ısı kütleli bir malzeme kullanılması gerektiği Arav tarafından bildirilmiştir (Arav, 2014).

Gregory M. Fahy ve William F. Rall kriyoprotektanların farklı konsantrasyonlarını içeren sulu çözeltilerini camlaştırmak için gerekli olan kritik

soğutma hızlarını 2007 yılında yayınlamıştır. Saf suyun kristalleşme olmaksızın cam haline gelebilmesi için  $100 \times 10^6 \text{ }^\circ\text{C/dk}$ 'nın üzerinde bir sıcaklık düşmesine ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir. Ayrıca KP'ların çoğunun %15'i (v/v) için neredeyse  $1 \times 10^6 \text{ }^\circ\text{C/dk}$  olması gerekir ki; bunun elde edilmesi zordur. Damlaların hacmi  $0,07 \text{ } \mu\text{l}$  olduğunda, KP'ların %15'i (v/v) yavaş soğutma hızlarına bağlı vitrifiye olabileceği gösterilmektedir. Bu yüzden, soğutma hızının artırılmasına göre hacmini düşürerek vitrifikasyon elde etmek daha çok uygundur. James H. Walton ve Roy C. Judd buz kristal büyümesinin hızını ölçerek  $65 \text{ mm/s}$  aralığında olduğunu bulmuştur. Soğuk bir metal yüzey üzerine yerleştirilen  $0.1 \text{ mm}$ 'lik bir damlanın kristalleşmesini önlemek için,  $0.0001$  saniye olan,  $1/6500 \text{ mm/s}$  arasında bir hız gerekmektedir. Eğer oda sıcaklığından  $-180^\circ\text{C}$ 'ye soğutmak için,  $0.1 \text{ } \mu\text{s}$ 'lik bir hızda veya  $78 \times 10^6 \text{ }^\circ\text{C/dk}$ 'da  $200^\circ\text{C}$  azaltmak gerekir. Bu soğutma oranı Baldis ve Bruggeller tarafından tahmin edilmiştir. Bununla birlikte, yavaş soğutma hızı ile başarılı şekilde dondurulabilen küçük bir damla saf suyun vitrifikasyona ulaşma yeteneği, bu soğutma hızına bağlı olarak mümkün olmamaktadır. Bu durum, küçük bir hacmin vitrifikasyon olasılığı üzerinde bağımsız bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Arav, 2014).

Saf suyun vitrifikasyonu birkaç araştırmacı tarafından denenmiştir. Hawkes'in yayınladığı bir deneyde, hızlı soğutma sırasında şekilsiz katı bir su damlasını tesadüfen elde edilmiştir. Burton ve Oliver, x-ray analizleri içinde bazı katı su buharından elde edilen herhangi bir kristal yapısını ortaya koyamamıştır. Görüldüğü gibi, bu başarılar çoğu kez soğutma hızına bağlı olmaksızın küçük hacimli örneklerin sayesinde elde edilmiştir. Meryman'ın 1966 yılında yayınladığı "Kriyobioloji" de, suyun süper soğutulması üzerine bir inceleme bulunmaktadır (Arav, 2014).

Oosit ve embriyolarda kriyomikroskopik üzerinde çalışmaya başlayan Arav, 1989 yılında "minimum damla hacmi" yöntemini geliştirmiştir. Arav vitrifikasyon için  $0.07 \text{ } \mu\text{l}$  ( $70 \text{ nl}$ ) hacim kullanmıştır ve küçük hacimli vitrifikasyon solüsyonlarının konsantrasyonu, büyük hacimli vitrifikasyon solüsyonlarının konsantrasyonundan yaklaşık %50 daha düşük bulunmuştur (Arav, 2014).

Embriyoların vitrifikasyonu, 1980'li yılların sonunda başlamasına rağmen, son zamanlarda klinik olarak uygulanmamaktadır. Vitrifikasyon için minimum hacim

kullanılması ile daha başarılı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bunun için üç önemli faktör dikkate alınmıştır (Arav, 2014).

1) Soğutma hızı (CR) ve ısınma hızı (WR): Yüksek soğutma hızı LN<sub>2</sub>'den elde edilirken, ısınma hızı ısıtılmış su banyosundan elde edilir. Numune sıvı azot içine daldırıldığında dk başına onlarca, yüzlerce veya binlerce derece Celcius soğuma hızı meydana gelir. Bu durum konteynır hacmine, ısı geçirgenliğine, solüsyonu oluşturan kimyasallara bağlıdır. Soğuma hızı özellikle soğumanın ilk aşamasında arttırıldığında, soğukluk oda sıcaklığından 0°C'ye düşmektedir. OPS ve elektron mikroskop ızgaraları gibi taşıma sistemleri kullanılarak elde edilen soğuma hızı, 0.25 ml'lik klasik payetlere göre 2-6 kat daha fazla arttırılmıştır. Arttırılan soğutma hızı sayesinde oosit ve embriyoların hayatta kalma oranları %37'ye kadar geliştirilmiştir. Son zamanlarda, fare oositlerinin başarılı vitrifikasyonu için ısınma hızının önemli bir değişken olduğu keşfedilmiştir (Arav, 2014).

2) Embriyoların süspansedildiği ortamın viskozitesi veya düşük sıcaklıklarda solüsyonun cam haline geçiş katsayısı, vitrifikasyon sırasında çeşitli KP'ların ve diğer katkı maddelerinin konsantrasyonu ve davranışı ile belirlenir. KP'ların daha yüksek konsantrasyonu ve daha yüksek cam haline geçiş sıcaklığından (Tg) dolayı buz nükleasyonu ve kristalizasyonun olma olasılığı azaltmaktadır. Farklı KP'lar ve diğer katkı maddeleri; farklı toksisiteye, penetrasyon oranına ve cam haline geçiş sıcaklığına sahiptir. Farklı KP'ların kombinasyonu çoğu kez viskozitenin ( $\mu$ ) artması, Tg artması ve toksisite seviyesinin azalması için kullanılmaktadır (Arav, 2014).

3) Hacim: Daha küçük bir hacim, vitrifikasyon için daha yüksek bir olasılıktır. Daha küçük hacimler ısı transferinin daha iyi bir hale gelmesini sağlar böylece soğuma hızlarını elde etmek daha çok kolaylaşmaktadır. Ayrıca nükleasyon olasılığı üzerine bağımsız etkisi olan küçük hacim, Guy-Lussac tarafından 200 yıl önce bulunmuştur. Birçok teknik, son yıllarda yapılan çalışmalarda bulunan yöntemlerin artmasıyla numune hacmini azaltmak için geliştirilmiştir (Arav, 2014).

Son zamanlarda geliştirilen yöntemler genellikle yüzey taşıyıcı sistemleri ve tüplü taşıyıcı sistemleri olarak iki kategoriye ayrılmaktadır (Saragust ve Arav, 2011).

Yüzey taşıyıcı sistemleri; elektron mikroskobu ızgaralığı (Martino ve ark. 1996b), minimum damla hacim tekniği (Arav ve Zeron, 1997), kriyotop (Kuwayama ve ark., 2005a; Kuwayama ve ark., 2005b), kriyoloop (Lane ve ark., 1999), yarım-payet (Vanderzwalmen ve ark., 2000), katı yüzey vitrifikasyonu (Dinnyes ve ark., 2000), naylon mesh (Matsumoto ve ark., 2001), kriyoleaf (Chian ve ark., 2005), direct cover vitrification (Chen ve ark., 2006), fiber plug (Muthukumar ve ark., 2008), vitrifikasyon spatulası (Tsang ve Chow, 2009), kriyo-E (Petyim ve ark., 2009), plastic blade (Sugiyama ve ark., 2010) ve Vitri-Inga'dır (Almodin ve ark., 2010). Tüplü taşıyıcı sistemler; plastik payet (Rall ve Fahy, 1985), açık uçlu modifiye payet (Vajta ve ark., 1998), kapalı uçlu modifiye payet (Chen ve ark., 2001), flexipet-denuding pipette (Liebermann ve ark., 2002), superfine OPS (Isachenko ve ark., 2003), kriyotip (Kuwayama, 2007), pipet tip (Sun ve ark., 2008), yüksek-güvenilir vitrifikasyon (Camus ve ark., 2006), mühürlenmiş modifiye payet (Yavin ve ark., 2009), kriyopette (Portmann ve ark., 2010), Rapid-i (Larman ve Gardner, 2010), ve JY payetidir. İki grubun herbiri kendine özgü avantajlara sahiptir. Yüzey taşıyıcı sistemlerde, damlanın hacmi (0.1 µl) kontrollü olabilmektedir ve bu sistemlerin çoğu, direkt sıvı azota ve çözündürme solüsyonlarına maruz kaldığından dolayı yüksek soğutma ve ısınma hızları elde edilmektedir. Tüplü taşıyıcı sistemler, kapalı sistemlerde elde edilen yüksek soğutma hızlarının avantajına sahiptir. Bu sistemlerin kullanımı daha kolay ve daha güvenlidir. Azalan vitrifiye hacim ve artan soğutma hızı, toksik ve osmotik hasar etkilerini en aza indirmek amacıyla KP konsantrasyonunu bir ölçüde azaltmayı sağlamaktadır (Yavin ve ark., 2009). Bu üç faktörün bir araya toplanması ile vitrifikasyonun olasılığı aşağıdaki genel denklemde gösterilmektedir (Arav, 2014):

$$\text{Vitrifikasyon olasılığı} = \frac{\text{Soğutma ve Isınma hızı (CR ve WR)} \times \text{Vizkozite}(\mu)}{\text{Hacim (v)}}$$

Vitrifikasyona bağlı 3 büyük problem vardır:

1) Kristalizasyon (dondurma boyunca),

2) Devitrifikasyon (depolama veya ısınma süresince kristalizasyon)

3) Kırılma ile enerjinin düşmesinden dolayı devitrifikasyona neden olabilen camsı solüsyonun kırılmasıdır.

Vitrifikasyon solüsyonu (VS) konsantrasyonu yüksek [%100 VS= %38 EG, 0.5 mol/l trehaloz ve %4 BSA içeren TCM199] iken sadece kırılma görülür, fakat 1 µl'lik düşük hacimlerde görülmez. Bunun anlamı kırılma olasılığı, Tg'nin veya VS'un vizkozitesinin artması ile artmaktadır. VS'nin (%50 VS) düşük konsantrasyonlarında, kırılmalar sadece çok yüksek soğutma hızında görülmektedir. Arav bu olgunun basit açıklamasını denklemler ile birlikte şu şekilde önermektedir (Arav, 2014):

Kırılma olasılığı= CR ve WR x  $\mu$  x v

Çünkü vitrifikasyonun olasılığı = CR ve WR x  $\mu$  x 1/v'dir.

1) Soğuma hızının (CR) artması vitrifikasyonun olasılığını artırır; bununla birlikte, kırılmaların olasılığını da arttırmaktadır.

2) Vizkozitenin ( $\mu$ ) artması vitrifikasyonun olasılığını artırır çünkü Tg artmaktadır; böylece kırılmaların olasılığı da artmaktadır.

3) Vitrifikasyonun olasılığını artıran ve aynı zamanda kırılmaların olasılığını azaltan tek parametre, minimum damla hacmi'nin değeri için azaltılan hacimdir (v).

VS'un yüksek konsantrasyonlarındaki olası kırılmaların artmasının sebebi cam haline geçiş sıcaklığı ( Tg) ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Kırılmalar sadece LN sıcaklığı (-196°C) ve sıvıyı cam haline dönüştüren sıcaklıkların altında ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca daha yüksek KP'ların konsantrasyonu ile birlikte bir solüsyon, daha yüksek bir Tg'ye sahiptir. Bu nedenle, sıcaklık gradyanı daha yüksek Tg durumunda olduğu gibi artarsa, kırılma olasılığı da artar. Arav çalışmasında, germinal vezikül aşamasında vitrifiye edilmiş oositler için klivaj ve blastosist oluşum oranlarını, sırasıyla %27 ve %14 ve M II aşamasında vitrifiye edilmiş oositler için klivaj ve blastosist oluşum oranları, sırasıyla %72 ve %38 bulmuştur. Arav; VS'nin düşük konsantrasyonlarını, süper soğutulmuş LN<sub>2</sub>'e doğrudan teması ve küçük hacim

özelliğini içeren yeni vitrifikasyon prosedürlerinin kırılmalar olmaksızın vitrifikasyonun yüksek olasılığını sağladığı ve soğuk hasarını azalttığı sonucuna varmıştır (Arav, 2014).

Kriyohasarin boyutu; embriyonik hücrelerin boyutuna, şekline aynı zamanda embriyoların membran geçirgenliğine, kalitesine ve duyarlılığında bağlıdır (Vajta ve Kuwayama, 2006). Triasilgliseroller, embriyoların hücre içi lipitlerinin çoğunu oluşturur (Diez ve ark., 2001) ve norepinefrin, dibutiril Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP), isoproterenol, forskolin ve teofilin gibi lipolitik ajanlar tarafından lipolizis indüklenebilir (Holm, 2003; Seamon ve ark., 1981). *Coleus forskohlii*'nin (Seamon ve ark., 1981) köklerinden türetilen diterpen forskolin, IVP embriyolarında delipidasyonunu indüklemek için kullanılır (Men ve ark., 2006; Pryor ve ark., 2009).

*Bos indicus* IVP embriyoları *Bos taurus* IVP embriyolarından daha hassasdır. Buna karşılık IVP sığır embriyoları, yüksek lipid konsantrasyonları nedeniyle in vivo muadillerine göre kriyoprezervasyona daha duyarlıdır. Sanches ve ark. (2013), *Bos indicus* IVP embriyolarının vitrifikasyonu öncesinde bir lipolitik ajanın embriyo sağkalımı, canlılık ve gebelik oranları üzerine etkilerini incelemek için iki deney yapmıştır. Deney 1'de, *Bos indicus* embriyoları, mezbaha kaynaklı ovaryumlardan elde edilmiştir ve iki gruba ayrılmıştır. Forskolin grubunda, embriyoların 5. gününde, in vitro kültür ortamına 10 mM forskolin eklenmiş ve 48 saat inkübe edilmiştir. Kültürün 7. gününde, kontrol (n = 101) ve forskolin (n = 112) gruplarından IVP ile geliştirilen blastosistler, EG ve DMSO kullanılarak kriyotop prosedürüyle vitrifiye edilmiştir. Kontrol grubu embriyoların blastosist reekspansiyonu ve hatching oranlarına [sırasıyla %79.2 (n: 80) ve %63.3 (n: 64)] kıyasla, forskoline maruz kalan embriyoların blastosist reekspansiyonu ve hatching oranları [sırasıyla %87.5 (n: 98) ve %70.5 (n: 79)] arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fakat kontrol grubuna göre Forskolin'e maruz kalan embriyoların sayısal olarak fazla olması, başka bir deneye öncülük etmiştir. Deney 2'de, ovum pick up ile elde edilen blastosistler, lipolitik maddeye maruz bırakılarak veya bırakılmayarak deney 1'deki gibi vitrifiye edilmiştir. Forskoline maruz kalan embriyoların (%48.8) gebelik oranları, kontrol grubuna (%18.5) göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında, OPU ile elde edilen oositlerden üretilen 1908 tane *Bos indicus* embriyoları, lipolitik maddeye

maruz bırakılmıştır. Bununla birlikte, blastosistler alıcılara aktarılmıştır ve çeşitli ırklarının embriyo gebelik oranları karşılaştırılmıştır. Elde edilen ortalama gebelik oranı %43.2 bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda, vitrifikasyon öncesi IVP *Bos indicus* embriyolarının forskoline maruz kalması, embriyolarının kriyotoleransını iyileştirdiği bildirilmiştir. Bu nedenle transfer sonrası gebelik oranlarında bir artış görülmüştür (Sanches ve ark., 2013).

Li ve ark. (2002) yaptığı çalışmada, tarımsal modernizasyonu tehdit altında olan yerli Çin ırkının korunmasını kolaylaştırmak ve Yunnan Sarı sığır oositleri için basit bir kriyoprezervasyon yöntemi sağlamak amaçlanmıştır. KOK'lar, mezbaha ovaryumlarından toplanmıştır ve 22-24 saat boyunca in vitro matüre edildikten sonra kriyoprezervasyon için seçilmiştir. OPS ile SSV yöntemleri karşılaştırılmıştır. OPS vitrifikasyon solüsyonu, %20 EG ve %20 DMSO'den üretilmiştir. SSV solüsyonu %35 EG, %5 PVP ve 0.4 M trehaloz karışımından oluşturulmuştur. Vitrikiye edilen ve çözöürölen matür oositler ya in vitro olarak fertilize edilmiştir ya da partenogenetik aktivite göstermiştir. Vitrikiye edilen matür oositlerin in vitro fertilizasyon sonrasında OPS grubundaki blastosistlerin klivaj (%38.3) ve gelişme (%12.5) oranları, SSV grubundaki blastosistlerin klivaj (%35.8) ve gelişme (%6) oranları ile kıyaslandığında istatistiki olarak fark bulunmamıştır. Vitrikiye edilen matür oositlerin partenogenetik gelişme oranları OPS (%8.2) ve SSV (%3.5) grupları arasında istatistiki olarak fark görölmemiştir. Vitrikiye edilmeyen kontrol grubunun in vitro fertilizasyon sonrası blastosist gelişme oranı (%22.6), vitrikiye edilen OPS ve SSV gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Yunnan Sarı sığır oositlerinin OPS ve SSV yöntemleri ile kriyoprezervasyonu sonrasında blastosist aşamasına kadar gelişebildiği ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Begin ve ark.'ın (2003) yaptığı çalışmada in vitro matüre edilen oositler ve in vivo üretilen erken safhadaki keçi embriyoları üzerine SSV ve kriyoloop (CL) vitrifikasyonunun etkisi ve toksisitesi araştırılmıştır. SSV yönteminde oositler, %35 EG, %5 PVP ve %4 trehaloz içeren solüsyonla vitrikiye edilmiştir. Oositleri içeren mikrodamlacıklar, kısmen sıvı azota daldırılacak şekilde soğutulmuş metal yüzey üzerine damlatılarak kriyoprezerve edilmiştir. CL yönteminde; %20 DMSO, %20

EG, 10 mg/ml fokol ve 0.65 M sükoz içeren solüsyon kullanılmıştır. Oositler, CL içinde askıya alınan CL solüsyonu tabakası üzerine transfer edilmiştir ve daha sonra sıvı azot içine daldırılarak vitrifiye edilmiştir. İn vivo üretilen embriyolar, aynı prosedürler kullanılarak vitrifiye edilmiştir. SSV mikrodamları içindeki oositler, 0.3 M sükoz içeren solüsyonda çözündürülmüştür. CL ile vitrifiye edilen oositler, 0.25 M ve 0.125 M sükoz içeren solüsyonlar kullanılarak çözündürülmüştür. SSV yöntemiyle vitrifiye edilen oositlerin (%60) ve embriyoların (%39) hayatta kalma oranları, kontrol grubuna (%100) göre önemli derecede düşük bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). CL yöntemiyle vitrifiye edilen oositlerin (%89) ve embriyoların (%88) hayatta kalma oranları, kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Hayatta kalan vitrifiye oositlerin (partenogenetik olarak aktive edilmiş) ve embriyoların (9 gün boyunca kültürlenmiş) klivaj ve blastosist oranları, kontrol grubundan istatistiksel olarak fark görülmemiştir ( $P > 0.05$ ) ve vitrifikasyon yöntemleri arasında da önemli derecede farklılık görülmemiştir ( $P > 0.05$ ). Kullanılan iki vitrifikasyon yönteminin keçi oositleri ve embriyolarının kriyoprezervasyonunda kullanılabileceği bildirilmiştir.

Lin ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada vitrifikasyon (kriyotop) ve yavaş dondurmanın klivaj aşaması insan embriyolarının hayatta kalması üzerine etkisi karşılaştırılmıştır. Kriyotop [287/298 (%96.3)] prosedüründe embriyoların hayatta kalması, klasik yavaş dondurulmaya [294/446 (%65.9)] göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Ayrıca implantasyon ve klinik gebelik oranları, yavaş donma prosedürüne (%7.1 ve %15.6) kıyasla kriyotop prosedürü (%24.3 ve %35.6) kullanıldığında önemli derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Bu nedenle vitrifikasyon yöntemi olan kriyotop'un klivaj aşamasındaki insan embriyoları için üstün kriyoprezervasyon yöntemini temsil ettiği bildirilmiştir.

Liang ve ark. (2012) yaptığı çalışmada, immatür buffalo oositlerin kriyoprezervasyonu için sitokalazin B (CB) ön uygulamasının ve katı yüzey (SSV), kriyotop (CT) vitrifikasyon yöntemlerinin etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Sitokalazin B ile ön işlemden geçirilen (CB+) veya ön-işlemden geçirilmeyen (CB-) KOK'lar, SSV ve CT ile vitrifiye edilmiştir. Vitrifiye edilip çözündürülen KOK'lar, IVM ve IVF için seçilmiştir. CT gruplarında vitrifikasyon



sonrası hayatta kalan oosit oranı (%82), kontrol grubuna (%100) göre anlamlı derecede düşük ( $P < 0.05$ ) bulunmuştur, ancak SSV grubuna (%71-72) göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Vitrifiye edilen gruplar arasındaki en yüksek maturasyon oranı, CB ile ön işlem olmaksızın CT grubunda (%32) gözlenmiştir. IVF sonrasında, klivaj ve blastosist oluşum oranları vitrifiye edilen gruplar arasında benzerdir fakat kontrol gruplarına göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Sonuç olarak, vitrifikasyon ve IVM sonrası oositlerin en yüksek hayatta kalma oranı, CT grubunda elde edilmiştir. CB ile ön işlem, vitrifiye edilen oositlerin hayatta kalma, maturasyon ve embriyo gelişim oranlarını arttırmamıştır.

Aree-uea ve ark. (2016) yaptığı çalışmada; fare oositleri, 5 dk için %7.5 EG ve %7.5 DMSO içeren DPBS'dan oluşan dengeleme solüsyonuna ardından 30 sn için %15 EG, %15 DMSO ve 0.6 M sükröz içeren DPBS'dan oluşan vitrifikasyon solüsyonuna maruz bırakılmıştır. Oositler, kriyotop üzerine yerleştirilmiş ve sıvı azot içine doğrudan bırakılarak vitrifiye edilmiş veya yarım payet üzerine yerleştirilmiş ve sıvı azot ile temas edilmeksizin 0.5 ml'lik bir payetin içindeki soğutulmuş havaya maruz bırakılarak vitrifiye edilmiştir. Sıvı azotta bir hafta depolamadan sonra, oositler çözündürülmüş, bir Piezo mikromanipülatörü kullanarak ICSI ile fertilize edilmiştir. Her iki gruptaki oositlerin hayatta kalması, fertilizasyon oranları ve blastosist gelişim oranı arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Her iki gruptaki iç hücre kütlesi ve trofektoderm hücrelerinin sayıları benzer bulunmuştur. Vitrifiye oositlerin fertilizasyon oranı ve ilk klivaj oranı, vitrifiye edilmemiş kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Bununla birlikte, vitrifiye edilen gruptaki 4 hücreli aşamadan blastosist aşamasına kadar gelişmesi, kontrol grubuna göre önemli derecede düşüktür. Çalışmanın sonucunda, yarım payet kapalı vitrifikasyon gerecinin açık kriyotop cihazı kadar etkili olduğu ortaya konulmuştur.

Oositlerin vitrifikasyonu, kumulus oosit komplekslerinde DNA hasarını etkiler (Men ve ark., 2003) ve böylece oosit gelişimsel yeterliliğini etkiler (Succu ve ark., 2007). Apoptozis, vitrifiye oositlerde hücrel hasara ve ölüme neden olan faktörlerden biri olduğundan dolayı (Shaw ve ark., 2000), apoptozisi düzenleyen BCL2 ve BAX genlerinin ekspresyonu da izlenmiştir. BCL2; ilk olarak CASPASE9 ile APAF1'in etkileşmesinden dolayı sitokrom C'nin mitokondriyal salınımını

düzenleyerek, ve ikinci olarak BAX'e bağlanarak ve son olarak C-MYC'nin neden olduğu apoptozisi bloke ederek, dişilerde germ hücre sağkalımını sağlar (Hussein, 2005; Kim ve Tilly, 2004). BAX, bir BCL2 antagonistidir ve sitoplazmik yüksekliği olan BCL2 antagonisti, oositlerde apoptozise neden olmak için yeterlidir (Morita ve Tilly, 1999). *Stress response gene P53, downstream effectors gene*'lerinin (BAX dahil) aktivasyonuna yol açan DNA hasarıyla indüklenir. Oositten salgılanan faktörler (OSF= oocyte secreting factors) ve apoptozis ile ilişkili genlerin ekspresyonu, koyun (Ebrahimi ve ark., 2010a; Ebrahimi ve ark., 2010b), keçi (Rao ve ark., 2012), sığır (Anchamparamathy ve ark., 2010) ve köpek (Turathum ve ark., 2010) vitrifiye oositlerinde çalışılmıştır.

Mahesh ve ark. (2017) yaptığı çalışmada, vitrifiye-çözdürülmüş oositlerin canlılığı, mayotik yeterliliği ve IVF sonrası gelişme yetenekleri ile değerlendirilen buffalo immatür KOK'lar vitrifikasyonu için en uygun kriyo-gerecin belirlenmesi amaçlanmıştır. Oositten salgılanan faktörler ve bunların reseptörleri (GDF9, BMP15, BMP2, TGFBR1) ve apoptozis ile ilgili genlerin ekspresyonu (BCL2, BAX, P53, C-MYC), *in vitro* maturasyon sonrası vitrifiye-çözdürülmüş oositlerde karşılaştırılmıştır. Mezbaha kaynaklı buffalo ovaryumlarından elde edilen KOK'lar; klasik payet (CS), açık uçlu modifiye payet (OPS), kriyoloop (CL), yarım payet (HS) veya kriyotop (CT) kullanılarak dimetil sülfoksit, etilen glikol ve sükrozun bir kombinasyonunda vitrifiye edilmiştir. Taze KOK'ları, diğer vitrifikasyon yöntemlerinde olduğu gibi sıvı azota daldırılmaksızın vitrifikasyon ve çözme solüsyonlarına maruz bırakıldı. HS ve CT'de çözülmesinden 2 saat sonra vitrifiye-çözdürülmüş KOK'larının canlılığı, taze ve LN<sub>2</sub> gruplarına benzer bulunmuştur, ancak CS ve OPS yöntemlerine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. İVM sonrası HS ve CT yöntemlerindeki oositlerin 1. polar body oranları, CS, OPS ve CL yöntemlerine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Tüm vitrifiye gruplarındaki oositlerin IVF sonrası blastosist evreye gelişim yeteneği, kontrol ve LN<sub>2</sub> gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Vitrifiye grupları arasında, HS, CT ve CL gruplarındaki blastosist oranı, OPS ve CS gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca, CT, HS ve CL gruplarında vitrifiye-çözdürülmüş olan KOK'lardaki GDF9, BMP15, BMP2, TGFBR1, BCL2, BAX, P53 ve C-MYC genlerinin ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile benzer olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmanın sonucunda, HS, CT ve CL'nin, buffalo immatür oositlerinin vitrifikasyonu için daha uygun kriyo-gereçler olduğunu rapor edilmiştir.

Chen ve ark. (2014) laboratuvarlarında sıvı helyum vitrifikasyonu adı verilen yeni bir teknoloji geliştirmiştir. Araştırmacılar, etkili bir ultra-hızlı vitrifikasyon yöntemi geliştirmek amacıyla sıvı azot (-196 °C) yerine sıvı helyumu (-269 °C, bir sıvının uygulanabileceği en düşük sıcaklık) kullanarak bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada sıvı helyum vitrifikasyonu yöntemi, immatür sığır oositlerinde maturasyon, gelişimsel yeterlilik ve gelişim ile ilişkili gen ekspresyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Çalışma; kontrol, sıvı azot vitrifikasyonu ve sıvı helyum vitrifikasyonu olmak üzere 3 gruptan oluşmuştur. Oositler vitrifiye edilmiştir ve daha sonra çözdürülmüştür. Sıvı helyum grubunda (%89.0, n: 260/292) morfolojik olarak normal oositlerin yüzdesi, sıvı azot grubuna (%81.1, n: 204/247) göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (P <0.05). Vitrifiye-çözdürülmüş oositler 24 saat in vitro maturasyona tabi tutulduğunda, sıvı helyum grubunda (%50.6, n: 147/292), sıvı azot grubuna (%42.6, n: 108/247) göre daha yüksek maturasyon oranı elde edilmiştir (P <0.05). Sıvı helyum vitrifikasyon grubundaki oositlerin IVF sonrasında klivaj ve blastosist oranları (%41.1, n: 118/292 ve %10.0, n: 29/292), sıvı azot vitrifikasyon grubundaki oositlerin IVF sonrasında klivaj ve blastosist oranlarına (%33.0, n: 85/247 ve %4.5, n: 10/247; P <0.05) kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca vitrifiye-çözdürülmüş oositler 24 saat maturasyona tabi tutulduğunda, büyüme farklılaşma faktörü-9 (GDF9 = growth differentiation factor-9), BAX (apoptozis faktörü) ve *zygote arrest 1* (ZAR1) ekspresyonu, kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile analiz edilmiştir. Bu genlerin ekspresyonu vitrifikasyondan sonra değiştirilmiştir. Sıvı helyum vitrifikasyon grubunda GDF9 ve BAX ekspresyonu, kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmezken, sıvı azot vitrifikasyonu ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark görülmüştür. Çalışmanın sonucunda, immatür sığır oositlerinin vitrifikasyonu için sıvı helyumun kullanılabilmesi ortaya konulmuştur. Ayrıca vitrifiye oositler için bu genlerin değiştirilmiş ekspresyon seviyeleri ile oositlerin bünyesinde bulunan gelişimsel yeterlilik arasında bir ilişki olduğu görülmüştür.

Arav ve ark. (2018) yaptığı çalışmada, fare ve sığır oositleri ve embriyolarını yeni bir otomatik vitrifikasyon cihazı (Sarah, Fertilesafe, Israel) kullanarak vitrifiye

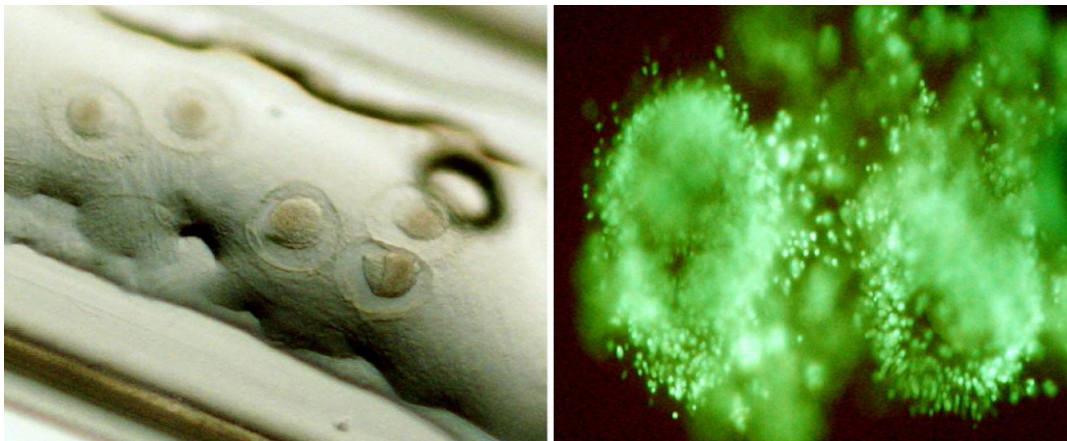
etmiştir. Fare oositleri (n= 40) ve embriyoları (8 hücre, n= 35 ve blastosist, n= 165), sığır oositleri (M II, n= 84) ve embriyoları [2 pronükleus (PN), n= 35] otomatik vitrifikasyon cihazı kullanılarak vitrifiye edilmiştir. Toplam 42 fare embriyosu (2 hücreli), 20 sığır embriyosu (2 PN) ve 150 sığır oositi (M II) vitrifiye edilmeyen kontrol grubu olarak kullanılmış ve blastosist aşamasına kadar geliştirilmiştir. Oosit ve embriyolar canlılık, klivaj, blastosist ve hatching oranları açısından değerlendirilmiştir. Fare oositlerinin %95'i (38/40) izotonik hacimlerini geri kazanmıştır ve hepsi canlılığını (%100) sürdürmüştür. Çözdürülen 8-hücreli fare embriyolarının blastosist oranı %94 (33/35) ve hatching oranı %80 (28/35) bulunmuştur. Çözdürülen fare blastosistlerinin hayatta kalma oranı %97 (160/165) ve hatching oranı %81 (135/165) bulunmuştur. Taze fare embriyolarının blastosist oranı %100 (42/42) ve hatching oranı %76 (32/42) bulunmuştur. Çözdürülen fare oositleri ve embriyoları ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Çözdürülen sığır embriyolarının (2 PN) hayatta kalma oranı %100, klivaj oranı %54 (19/35) ve blastosist oranı %9 (3/35) bulunmuştur. Taze sığır embriyolarının (2 PN) klivaj oranı %65 (13/20) ve blastosist oranı %20 (4/20) bulunmuştur. Vitrifiye edilmiş M II aşamasındaki sığır oositlerinin hayatta kalma oranı %100 (84/84), klivaj oranı %73 (61/84) ve blastosist oranı %7 (6/84) bulunurken; vitrifiye edilmeyen kontrol grubu M II aşamasındaki sığır oositlerinin klivaj oranı %83 (125/150) ve blastosist oranı %11 (17/150) bulunmuştur. Çözdürülen sığır oositleri ve embriyoları ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Çalışma sonucunda yeni otomatik vitrifikasyon cihazı kullanılarak oositlerin ve embriyoların hayatta kalma oranları artırılmıştır. Dünya çapında gametlerin, embriyoların ve reproduktif dokuların vitrifikasyon talebinin artmasından dolayı otomatik bir vitrifikasyon cihazının kullanılması, tüm vitrifikasyon sürecinin standart hale getirilerek daha kolay bir şekilde vitrifikasyon işleminin yapılabileceği düşünülmüştür.

#### **2.5.4. Yavaş dondurma ve Vitrifikasyon Sonrasında Oositlerin Kurutulması**

LN<sub>2</sub> içindeki kriyoprezerve edilmiş oositlerin depolanması, bakımı, depo alanı, donatımı ve masrafların koşullarına dikkat edilerek özen göstermek gerektirmektedir. Arav sonuç olarak, gamet prezervasyonu için alternatif bir yöntem aramıştır: vitrifikasyon ve bunu takiben kurutma. Depolama kuru halde yapılır. Arav

tarafından yapılan çalışmada, yavaş dondurma-kurutma, hızlı dondurma-kurutma ve vitrifikasyonla-kurutma yöntemleri karşılaştırılmıştır. İn vitro matüre edilen M II aşamasındaki sığır oositlerinin (n=68) yavaş dondurma-kurutma, hızlı dondurma-kurutma ve vitrifikasyon-kurutmadan sonra hayatta kalması ve yeniden elde edilmesi üzerine üç dondurma yöntemi karşılaştırılmıştır. A grubunda 10 oosit 4°C/dk'lık bir soğutma hızında yavaş dondurma ile (Israil, IMT cihazı MTG-1314 kullanılarak); B grubunda 24 oosit 150°C/dk'lık bir soğutma hızında hızlı dondurma ile (Israil, IMT cihazı MTG516 kullanılarak); C grubunda 34 oosit 20.000°C/dk'dan daha büyük bir soğutma hızında IMT-4 solüsyonu içinde (trehaloz bazlı solüsyon) minimum damla hacmi yöntemi kullanılarak vitrifikasyon ile kriyoprezerve edilmiştir. Liyofilizasyon süreci 24 saat süreyle VirTis sihirbazı ile gerçekleştirilmiştir (raf sıcaklığı -55°C'ye ayarlanır ve vakum 10 mTorr idi). Rehidrasyon işlemi, 0,5 mol/L trehaloz ile takviye edilerek dengelenmiş TCM199 kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Oositin hayatta kalması, canlı/ölü floresan boyası (SYTO/PI) kullanılarak değerlendirilmiştir (Arav, 2014).

Grup A için, oositlerin %70'i rehidrasyon sonrasında yeniden elde edilmiştir fakat sadece yedisinden biri canlı olarak boyanmıştır (%14). Grup B için, oositlerin %71'i yeniden elde edilmiştir ve 17'sinden 10'u canlı olarak boyanmıştır (%59). Grup C için, oositlerin %88'i yeniden elde edilmiştir ve 30'undan 23'ü canlı olarak boyanmıştır (%77; p<0.05; şekil 2.6; Arav, 2014).



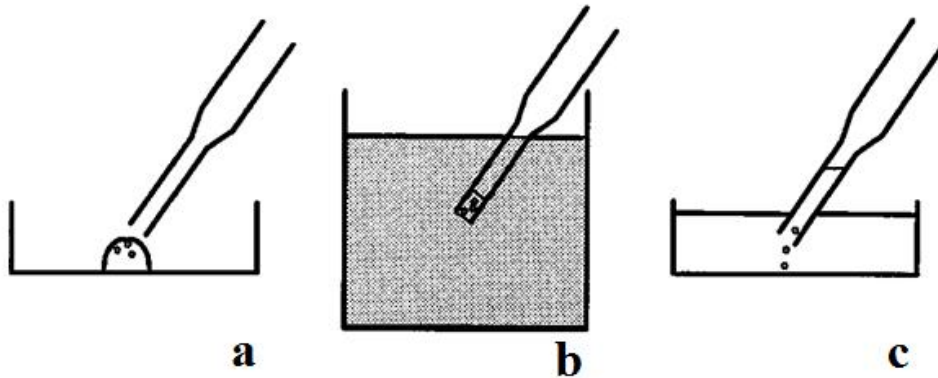
**Şekil 2.6.** Vitrifiye ve liyofilize edilmiş oositler. Vitrifikasyon ve kurutulduktan sonra kriyotop taşıyıcısındaki kuru oositler ve sağ tarafta rehidrasyon sonrası canlı/ölü floresan boyası ile boyanan oositler (Arav, 2014).

Oositlerin liyofilizasyonu, gamet bio-bankası için çığır açıcı yeni bir yöntemdir. Vitrifikasyon, sadece sıvı azot içinde prezervasyon için değil aynı zamanda kurutma işlemine de asıl yöntem olarak onaylanmıştır (Arav, 2014).

## 2.6. Günümüz İtibari ile Kriyobiyolojik Uygulamalarda Vitrifikasyon Yöntemleri

### 2.6.1. Açık Uçlu Modifiye Payet (OPS, Open Pulled Straws ) Yöntemi

Fransız mini-payetler (250  $\mu$ l, IMV, L'Aigle, Fransa) sıcak bir plaka üzerinde ısıtıldıktan sonra i çapı 1.7 mm'den yaklaşık 0.15 mm'ye ve orta kısmın duvar kalınlığı 0.8 mm'den yaklaşık 0.07 mm'ye düşene kadar elle çekilerek OPS payetleri elde edilmiştir. Havada soğutulan payetler daha sonra bir bistüri ile en dar noktadan kesilmiştir. OPS payetlerine oosit yerleştirilmesi, payetin en dar ucunun oosit veya embriyoları içeren 1-2  $\mu$ l'lik damlacığın üzerine dokundurularak kapillar etkiyle sağlanmıştır (şekil 2.7). Oosit veya embriyo yüklenen payet, dar ucundan hemen sıvı azota daldırılmıştır (Vajta ve ark., 1998). Çözdürme işlemi, payetin dar ucunu doğrudan zdrme solüsyonuna yerleştirerek gerçekleştirilmiştir. Vitrifiye olan solüsyon, 1-2 sn içinde sıvı hale gelir, bunun üzerine zdrme solüsyonu payete girer. Hemen sonra, çökeltme yoluyla, oosit veya embriyolar payetten zdrme solüsyonuna ker.



**şekil 2.7.** Açık uçlu modifiye payet (OPS) yöntemi. (a) Oositlerin veya embriyoların, OPS payetine yüklenmesi, (b) OPS payetinin sıvı azot içine daldırılması, (c) OPS payetinin zdrlmesi.

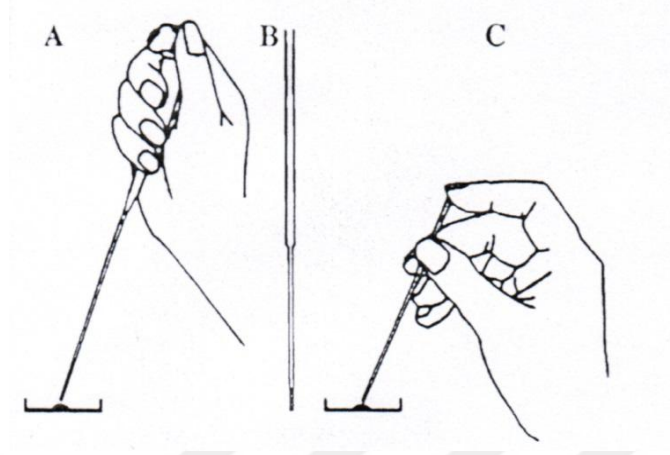
Li ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada; oositler öncelikle 30–45 sn süre ile %20 CS, %10 EG ve %10 DMSO katkılı TCM199 medyumunda süspanse edilmektedir. Daha sonra 20 sn süre ile %20 CS, 0.5M sükröz, %20 DMSO ve %20 EG katkılı TCM199 medyumuna aktarılmaktadır. Son olarak, oositler kapillar etki aracılığı ile OPS payetine çekilerek hızlıca sıvı azot içerisine daldırılmıştır. Dar uçlu payetler doğrudan %20 CS ve 0.25 M sükröz içeren TCM199 medyumunda, 37°C ısıda ve 1 dk süre ile çözündürülmektedir. Bu işlemden sonra oositler, %20 CS ve 0.15 M sükröz içeren TCM199 medyumuna aktarılarak 5 dk süre ile bekletilmektedir.

### **2.6.2. Kapalı Uçlu Modifiye Payet (CPS, Close Pulled Straws ) Yöntemi**

Oositler (bir payette 4-6 adet) 5 dk boyunca 1.5 mol/l EG ile ön işleme tabi tutulmuştur. Oositler dengeleme boyunca karıştırılmıştır ve bir petri üzerindeki bir damla (200 µl) EG5.5 içine transfer edilmiştir. Daha sonra başka bir damlaya (200 µl) aktarılmıştır. Bir enjektör kullanılarak payetin ucundan 2 mm vitrifikasyon medyumuna, 2 mm hava, 2 mm oositleri içeren vitrifikasyon medyumuna, 2 mm hava ve 2 mm vitrifikasyon medyumuna çekilmiştir (Şekil 2.8. A, B). Oositleri içeren vitrifikasyon medyumuna hava ve medyum olmak üzere iki küçük segment ile izole edilmiştir. Oositler, OPS yönteminde sıvı azot ile doğrudan temas edebilirken, CPS'nin bu kapalı yükleme sistemi sayesinde sıvı azot ile doğrudan temas etmemektedir. Prosedürler 22-24°C arasında bir oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Oositler 1 dk boyunca EG5.5 ile maruz bırakılmıştır. Oositlerin dondurulması ve saklanması için sıvı azot içine daldırılmıştır (Chen ve ark., 2001).

Oositler, 1 saat ile 5 gün arasında sıvı azot içerisinde depolandıktan sonra çözündürülme işlemi için CPS, sıvı azottan çıkarılmıştır. Modifiye payetin karşı ucu işaret parmağı kullanılarak kapatılmıştır (Şekil 2.8. C). Payetin içeriği, daha sonra ısı değişiminden kaynaklanan payet içerisinde artan hava basıncının kullanılması ile 0.5 mol/l sükröz (400 µl) içeren bir damla içine aktarılmıştır. Oositler, daha sonra 4-kuyucuklu petri içerisindeki 0.5, 0.25 ve 0.125 mol/l'lik sükröz solüsyonları içine aktarılmıştır. Oositler her solüsyon içinde 2.5 dk bekletilmiştir. Oositler daha sonra

yıkılarak kültür medyumunun içine aktarılmış ve inkübe edilmiştir (Chen ve ark., 2001).

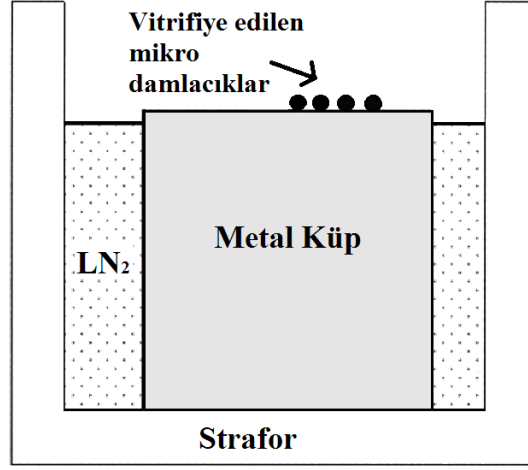


**Şekil 2.8.** Kapalı Uçlu modifiye Payet (CPS) yöntemi. (A) Oositlerin CPS payetine yüklenmesi, (B) CPS payetinin sıvı azot içine daldırılması, (C) CPS payetinin çözündürülmesi (Chen ve ark., 2001).

### 2.6.3. Katı Yüzey Vitrifikasyonu (SSV, Solid Surface Vitrification ) Yöntemi

Dinnyes ve ark.'nın (2000) yaptığı çalışmada matür oositler, %0.1'lik hiyaluronidaza kısa bir süre maruz bırakılıp pipetleterek kısmen veya tamamen kumulus hücrelerinden sıyrılmıştır. Oositler, %20 fetal sığır serumu (v:v) içeren TCM 199 medyumunda üç kez yıkanmıştır ve daha sonra %20 FBS, % 4 EG (v:v) içeren TCM 199 medyumunda 12–15 dk boyunca 39° C'de dengelemeye tabi bırakılmıştır. Dengelemeyi takiben, 5 ile 10 oosit grubu %35 EG, %5 PVP, 0.4 M trehaloz, %20 FBS ve TCM 199 içeren vitrifikasyon solüsyonunun damlalarında 25-30 sn süreyle üç kez durulanmıştır. Daha sonra oositler trehaloz solüsyonuna yerleştirilmiştir ve sıvı azot içine kısmen daldırılarak -150 ila -180°C'ye kadar soğutulan ve alüminyum folyo ile kaplanan çelik bir küpün yüzeyine damlatılmıştır (Şekil 2.9). Hacimleri 1 ile 2 µl arasında değişen damlalar hemen vitrifiye edilmiştir. Vitrifiye edilen damlalar, uzun süreli depolamak için (2 - 3 hafta) sıvı azot içerisinde soğutulmuş pens ile 1 ml'lik kriyoviyaller içine aktarılmış veya hemen çözündürülmesi için 3 dk boyunca 39°C'deki 0.3 M'lık trehaloz solüsyonuna maruz bırakılmıştır. Hayatta kalan oositler, oosit membranına ve zona pellusida bütünlüğüne bakılarak değerlendirilmiştir.





**Şekil. 2.9.** Katı yüzey vitrifikasyonu (Dinnyes ve ark., 2000).

Li ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada; öncelikle kısmen denüde edilmiş oositler 12-15 dk süre ile oda ısısında, %4 EG ve %20 CS katkılı TCM199 medyumunda ekilibrasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra 5-10 adetten oluşan oosit grupları 25-30 s süre ile vitrifikasyon solüsyonundan (%35 EG, %20 CS, %5 PVP ve 0.4 M trehaloz içeren TCM199 medyumunu) oluşturulan damlacıklar içinde 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra pipetlenen oositler sıvı azot içerisindeki soğutulmuş bir alüminyum folyo üzerine doğrudan 10–15 µl'lik damlalar halinde damlatılmıştır. Sıvı azot tankından çıkarılan godelerin içindeki damlacıklar 39°C ısıdaki 0.3 M trehaloz solüsyonu içinde 3 dk süre ile çözdürülmüştür. Daha sonra oositler TCM199 ve %20 CS içinde 3 kez yıkanmıştır.

#### **2.6.4. Minimum Damla Hacmi (MDS, Minimum Drop Size ) Yöntemi**

Papis ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada, %20 FCS içeren TCM199 medyumunu, ana solüsyon olarak kullanılmıştır. Vitrifikasyon işlemi için 5.5 M (%31 v/v) EG ve 1.0 M süktroz içeren vitrifikasyon solüsyonu kullanılmıştır. Dengeleme işlemi için EG'nin farklı konsantrasyonlarına ve farklı maruz kalma sürelerine tabi tutulmuştur. Ön dengeleme, dengeleme ve ısınma/seyreletme dahil olmak üzere prosedürlerin çoğu yaklaşık 35°C ile 37°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Farklı vitrifikasyon solüsyonlarından geçirilen oositler, sıvı azot seviyesinin yaklaşık 15 cm

yukarısından pastör pipeti yardımıyla sıvı azot ile dolu olan strafor köpük kutusunun içine doğrudan bırakılmıştır.

### 2.6.5. Kriyotop (CT, Cryotop) Yöntemi

Salzano ve ark.'nın (2014) yaptığı çalışmada 7. gündeki blastosistler, daha önce tarif edilen kriyotop yöntemiyle (Kuwayama ve Kato, 2000) vitrifiye edilmiştir. Bütün ekilibrasyon ve seyreltme adımları 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Her blastosist, 3 dk boyunca 200 µl'lik VS1 damlacığı içine bırakılmış, daha sonra 20-25 sn için 20 µl'lik VS2 damlacığı içine aktarılmıştır. Daha sonra blastosistler, kriyotopun uç kısmına bir cam kapillar ile aktarılmıştır. Aktarılma işleminden sonra, hemen hemen tüm solüsyon kriyotop üzerinden uzaklaştırılmış ve kriyotop hızla sıvı azot içine daldırılmıştır. Kriyotop (Şekil 2.10), kılıf sayesinde korunarak sıvı azot içinde saklanılmıştır. Embriyoların çözdürülmesi işleminde kriyotop kılıfından çıkarılmıştır ve kriyotop'un embriyoları içeren ucu 1 dk için 1 ml'lik 0.25 M sükröz solüsyonuna daldırılmıştır. Embriyolar, 5 dk için 200 µl'lik 0.15 M sükröz solüsyonu damlası içine aktarılmıştır. Çözdürülmüş blastosistler, H199 medyumunu (25 mM Hapes, 2 mM sodyum bikarbonat, 2 mM sodyum piruvat, 1 mM L-glutamin, 10 µl/ml amfoterisin B ilave edilmiş TCM199 medyumunu) + %10 FCS içinde yıkanmıştır ve 2 gün süreyle kültürlenmiştir.



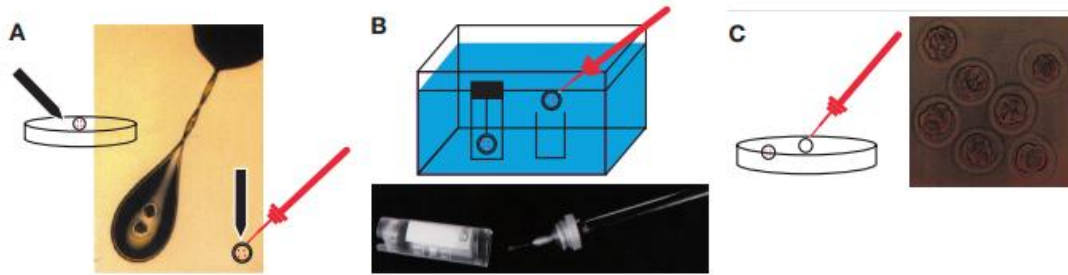
Şekil 2.10. Kriyotop (Anonim, 2017).

### 2.6.6. Kriyoloop (CL, Cryoloop) Yöntemi

Bir kriyoviyalin kapağına yerleştirilmiş, paslanmaz çelik bir boru üzerine monte edilmiş ufak bir naylon ilmekten (20 µm genişliğinde, 0.5-0.7 mm çapında) oluşan kriyoloop adı verilen bir sistem Lane ve ark. (1999) tarafından tasarlanmıştır.

Kapaktaki metal bir ek parça, istenirse ilmeğin manipülasyonu için küçük bir mıknatıslı sapın kullanılmasını sağlar (Şekil 2.11. C).

Lane ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada, oositler ve embriyolar, iki adımlı kriyoprotektan solüsyonu kullanılarak vitrifiye edilmiştir. Başlangıçta, oositler ve embriyolar, 1 ila 3 dk için %10 DMSO ve %10 EG içeren vitrifikasyon solüsyonu (1. solüsyon) içine yerleştirilmiştir. Daha sonra ~ 20 sn için %20 DMSO, %20 EG, 10 mg/ml ficol ve 0.65 M sükroz içeren vitrifikasyon solüsyonuna (2. solüsyon) aktarılmıştır. Hücreler daha sonra ince bir tabaka oluşturmak için 2. solüsyona batırılmış olan kriyolop'a transfer edilmiştir (Şekil 2.11. A). Hamster embriyoları için 10-12 embriyo ve sığır embriyoları için 3-6 embriyo ilmeğe yerleştirilmiştir. Naylon ilmekte asılı olan embriyolar daha sonra doğrudan sıvı azot içine daldırılmıştır. Önceden sıvı azot altına batırılan kriyoviyalin embriyoları içeren ilmeği, sıvı azot içeren kriyoviyal içine daldırılarak bir hareketle sıvı azot altında kapatılmıştır (Şekil 2.11. B).



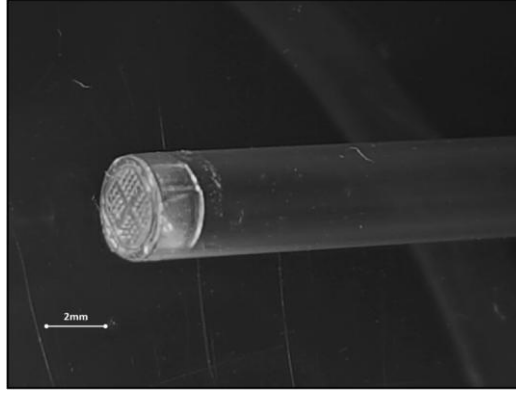
**Şekil 2.11.** Kriyoloop (CL) yöntemi. (A) Bir ilmek içinde tutulan sekiz-hücreli sığır embriyolarını göstermektedir. (B) İlmek doğrudan sıvı azot içine daldırılır ve ilmek sıvı azotun altındayken kapağı kapatılır. (C) Vitrifikasyon ve çözündürme sonrası normal olarak gelişen hamster embriyolarını göstermektedir (Lane ve ark., 1999).

Oositler ve embriyolar, sükrozla iki adımlı seyreltme kullanılarak çözündürülmüştür. Sıvı azot altına batırılmış kriyoviyal açılarak hücreleri içeren ilmek, sıvı azottan çıkarılmıştır ve 0.25 M sükroz ihtiva eden baz medyumlu bir kuyucuğa doğrudan aktarılmıştır. Oositler/embriyolar, ilmekten hemen çözündürme solüsyonuna düşmüştür. Oositler 2-5 dk bu solüsyonda bekletildikten sonra 5 dk için 0.125 M sükroz içeren baz medyumuna aktarılmıştır. Daha sonra, oositler/embriyolar

5 dk süreyle baz medyumunda iki kez yıkanarak kültür medyumuna aktarılmıştır (Lane ve ark., 1999).

### 2.6.7. Sarah Vitrifikasyon Yöntemi

Arav ve ark. (2018) yaptığı çalışmada, fare oositlerini (n= 40), 8 hücreli fare embriolarını (n= 35), fare blastosistlerini (n= 165), sığır oositlerini (M II, n= 84) ve sığır embriolarını (2 PN, n= 35) Sarah adlı otomatik vitrifikasyon cihazı ile vitrifiye etmişlerdir. İlk 0.25 ml'lik payetin içine 5 oosit/embriyo yüklenmiştir. Payetin ucu 50 µm'lik gözeneklerden oluşan özel kapsül (Şekil 2.12; Fertilesafe, Nes-Ziona, İsrail) ile kapatılmıştır. Payet daha sonra Sarah cihazının robotik koluna dikey olarak yerleştirilmiş ve tutucuya bağlanmıştır. Cihaz daha sonra çalıştırılmıştır ve payeti tutan robotik sap, çeşitli solüsyonlar içeren tüpler içine daldırılmıştır. Fare numunelerinin her biri 3 dk için 3 farklı (%30, %60 ve %100) dengeleme solüsyonlarına, ardından 1 dk için %100 vitrifikasyon solüsyonuna maruz bırakılmıştır. Sığır numuneleri, 6 farklı dengeleme solüsyonunun (%10, %20, %40, %60, %80 ve %100) her birinde 90 sn maruz bırakılmıştır. Fareler ve sığırlar için %100 dengeleme solüsyonu; %7.5 DMSO, %7.5 EG, %20 FCS içeren TCM199'dan oluşturulmuştur. Daha sonra numuneler, 30 sn için %75 ve %100 vitrifikasyon solüsyonuna maruz bırakılmıştır. Fareler ve sığırlar için %100 vitrifikasyon solüsyonu; %18 DMSO, %18 EG, 0.5 M trehaloz, %20 FCS içeren TCM-199'dan oluşmaktadır. Numuneler %100 vitrifikasyon solüsyonuna daldırıldıktan sonra ve LN<sub>2</sub> içine daldırılmadan önce bir adım vardır. Bu adımda payetler, vitrifikasyon solüsyonunu çıkarmak ve mümkün olan en düşük hacmi elde etmek için emici kağıtlar içeren tüp içine daldırılmaktadır. Tüm solüsyonlar 24°C'de tutulmuştur. Payetler doğrudan LN<sub>2</sub> içine daldırıldığında vitrifikasyon döngüsü tamamlanmıştır. Bu noktada, payetler tutucudan ayrılmıştır ve saklanması için LN<sub>2</sub> tankları içerisine yerleştirilmiştir.



**Şekil 2.12.** Sarah vitrifikasyon yönteminde kullanılan 0.25 ml'lik bir payetin ucuna tutturulmuş özel kapsül (Arav ve ark., 2018).

Çözdürme prosedüründe payetler, ilk olarak 5 sn için 37°C'deki %100 çözdürme solüsyonuna daldırılır ve daha sonra Sarah cihazının robotik koluna dikey bir şekilde yerleştirilir. Vitrifikasyon için kullanılan işlemin tersine payetler, oda sıcaklığında tutulan %100, %50, %25 ve %12.5'lik çözdürme solüsyonlarını (1 M sükröz ve %20 FCS içeren TCM199 solüsyonundan oluşturulmuş) içeren, ısı kontrollü 5 ml'lik tüpler içine otomatik olarak daldırılarak numuneler çözdürme solüsyonlarının herbirine 2.5 dk için maruz bırakılmıştır. Oosit ve embriyolar değerlendirilmiştir (Arav ve ark., 2018).

## 2.7. İn Vitro Oosit Maturasyonu

Oosit maturasyonu; dişi üreme hücresinin kromozom sayısını (2n) yarıya düşürerek, haploid (n) sayıda kromozoma sahip yeni hücrelerin oluşumuyla sonlanan, bir hücre bölünme çeşitidir. Oosit maturasyonu, üreme hücresinin mayoz bölünme sırasında profaz I evresinden metafaz II evresine kadar olan olaylar zinciri olarak kabul edilmektedir (Doğan, 2015).

Oogenezis, olgun gametlerdeki dişi birincil seks hücrelerinin farklılaşması sürecidir. Primer germ hücreleri (gonositler), embriyo *yolk* kesesi ve allantois duvarında lokalizedir. Morfogenetik hareketlerin bir sonucu olarak, yer değiştirme yeteneğinden dolayı, bağırsak mezenterinin somatik hücreleri ile birlikte göç ederler ve primer, farklılaşmamış gonadların oluşmasına yol açar. Gonadlar doğrultusunda göç eden birincil seks hücreleri, sitoplazmik uzantıları (40 mikron uzunluğunda),

psödopodia ve filopodia geliştirerek düzensiz şekiller edinir. Bu yapılar, hareketleri sırasında sürekli teması sürdürmelerine izin verir (Rybska ve ark., 2018). Gonadlara doğru trafiği yönlendiren primordial germ hücreleri (gonositlerin), Transforme Edici Büyüme Faktörü- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1= Transforming Growth Factor Beta 1) ve ekstrasellüler matris proteinleri fibronektin ve lamin gibi faktörlerin katıldığı süreçte kemotaktik özelliğe sahiptir. Ek olarak, yüzey embriyonik proteinleri (SSEA-1= surface embryonic proteins), yüzey adezyon proteinleri (NCAM= surface adhesion proteins) ve kaderinler, göç eden primer hücrelerin grupları arasındaki iletişimi sürdürmekten sorumludurlar (Diaz ve ark., 2007). Gonadın korteks kısmına girdikten sonra, primer seks hücreleri oogoniya dönüşür ve ovaryumun farklılaşmasını başlatır. Oogonia, sayılarında önemli bir artışa izin veren yüksek mitotik aktiviteyi sürdürmektedir. Dişi üreme hücresinde mayoz bölünme, fetal dönemin sonunda başlar. Leptoten, zigoten, pakiten ve diploten yoluyla ilk mayoz bölünmesinin profaz aşamaları boyunca ilerler. Diplotende, mayoz bölünmede bir duraklama meydana gelir ve sonuçta ortaya çıkan primer oositler pubertaya kadar bu aşamada muhafaza edilir (Rybska ve ark., 2018). Mayoz bölünmede ilerleme, puberteden sonra gonadotropinlerin (özellikle de LH) etkisi ile başlar (Doğan, 2015; Mayes ve Sirard, 2001). İlk mayoz bölünme asimetriktir ve sonucunda 2 hücre oluşur. Hücrelerden biri tam bir sitoplazmaya sahiptir ve sekonder oosit adını alır, diğeri yok denecek kadar az sitoplazmaya sahiptir ve 1. polar body adını alır. Polar body, kromozomlar ile birlikte çeşitli sitoplazmik organelleri içerir (Çetin, 2004). Mayoz I ovulasyondan önce tamamlanır. Bunu takiben 2. mayoz bölünme başlar ve ovulasyon mayoz II'nin metafaz evresinde gerçekleşir (Doğan, 2015). Oositler, metafaz II aşamasına geçtiğinde mayoz bölünme tekrar engellenir. Bu aşamada ovumun farklılaşma süreci tamamlanmıştır. Oosit içinde mevcut olan kromozomlar, mayoz bölünmenin sonucunda haploid sayıya iner. Mayozun ikinci kez engellenmesi, sperm-oosit reaksiyonu ile ortadan kalkar. Bu nedenle tüm türlerde oosit mayozunun tamamlanması için gerekli olan koşul, oositin fertilizasyonudur (Mayes ve Sirard, 2001; Rybska ve ark., 2018). Oositin 2. mayoz bölünmesinde, oluşan iki hücreden biri sitoplazma yönünden daha zengindir ve oositi oluşturur. İkinci hücre ise, sitoplazma yönünden daha fakir olmasına rağmen yine de mitokondri, ribozom ve kortikal granüllere sahiptir. Bu küçük hücreye 2. polar body

denir (Doğan, 2015). Oogenezis, fetal gelişim sırasında başlar ve dişinin ömrü boyunca sürer. Bununla birlikte, sadece az sayıda oosit olgunlaşır ve ovulasyona uğrarken, kalan ovaryum folikülleri atrezi olur (Rybska ve ark., 2018).

Omurgalılarda genişletilmiş diploten aşamasına diktiyoten denir. Bu aşama, daha önce profazda yoğunlaşan nükleer kromatinin saçılmasıyla karakterizedir. Diktiyoten fazında hücre siklusunun bloke edilmesi, oosit farklılaşmasının sürecini engellemez. Bu aşamadaki oositler, oogoniadan çok daha büyüktür ve daha fazla hücrenel organelle sahiptir. Bu süre boyunca yoğun hücre gelişimi, hacmin aralıksız olarak artmasıyla meydana gelir. Gamet kitlesinin çoğalması, oosit yaşamının ilk evrelerinde embriyonun uygun fertilizasyonu ve korunması için gerekli olan ve oositin kendisi tarafından sentezlenen proteinler, lipidler ve RNA'lar ile birlikte kumulus ooforusun çevresindeki gerekli metabolitleri kullanmakla mümkündür. Mayoz bölünmelerini durdurma mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Bu mekanizmanın foliküler hücreler tarafından salgılanan oosit maturasyon inhibitörleriyle düzenlendiğine inanılır. Bunlar; OMI (Oosit Maturasyon İnhibitörleri) ve siklik adenozin monofosfat (cAMP= Cyclic Adenosine Monophosphate). Nükleer maturasyonun ilk aşamasının tamamlanması, her ovulasyondan önce sekonder oositlerin oluşumuyla sonuçlanır (Rybska ve ark., 2018).

Oosit maturasyonu oositin diploten evresinden metafaz II evresine (nükleer maturasyon) ilerlediği karmaşık bir olgudur. Diploten aşamasından metafaza geçiş, diakinezis olarak adlandırılır. Oosit, folikülden atıldığında (Pincus ve Enzmann, 1935) veya ovulatör LH dalgalanmasına (Callesen ve ark., 1986; Channing ve ark., 1978; Ireland ve Roche, 1982; Masui ve Clarke, 1979; Peng ve ark., 1991) yanıt olarak mayozu sürdürür. Diakinezis sırasında nükleer membran katlanmaya başlar, nükleer gözenekler kaybolur ve daha sonra nükleer membran fragmanları hızlıca kaybolur (Kubelka ve ark., 1988; Szollosi ve ark., 1972). Bu olaylar, mayozun yeniden başlamasının ilk görünür belirtisi olan germinal vezikül yıkımı (GVBD) olarak bilinir. Nükleolus, sitoplazma ile temas ettikten sonra hızla kaybolur. Sığırlarda, GVBD folikül veya ovulatör LH sinyali çıkarıldıktan sonra saatler içinde ortaya çıkar. Sığırlarda, 6.6 saat kültürle, oositlerin %50'si GVBD'ye maruz kalmıştır (De Loos ve ark., 1994; Sirard ve ark., 1989). Daha sonra, kromozomlar daha da

yoğunlaşır. Kinetokorlar ortaya çıkar, mikrotübüller kromozomları çeker ve mikrotübüller M I metafazik plakasını oluştururlar. Anafaz I sırasında homolog kromozomlar ayrılır ve kromozomlar kendi kutuplarına geçer. Telofaz I sırasında, her bir kutupta bulunan kromozomlar bir nükleer membran ile çevrilir. Kromozom replikasyonu olmadan ikinci mayoz bölünmesi hemen gerçekleşir ve oosit metafaz II'ye ulaşır. Fertilizasyon gerçekleşene kadar oositin metafaz II evresindeki blokajı devam eder. Fertilizasyon gerçekleşince oosit mayoz bölünmeyi tamamlar ve pronükleus oluşur. Oosit maturasyonu ayrıca, fertilizasyonu ve erken embriyonik gelişimi desteklemek için hücreyi hazırlayan sitoplazmik seviyedeki dönüşümleri de içerir (sitoplazmik maturasyon). Tek başına nükleer olgunlaşmanın tamamlanması, sonraki embriyo gelişimini garanti etmemektedir (Sirard ve ark., 1989; Yang ve ark., 1998).

Ovum hücresi, organizmanın en büyük hücrelerinden biridir. Memeli oositlerinin çapı, 120 ila 150 µm arasındadır. Yaşamının ilk günlerindeki oosit, uygun embriyo gelişimi için temel olan rezerv maddelerle doldurulur. Dişi gamet, oosit ve somatik hücreler arasındaki iletişimi sürdürmekle sorumlu olan korona radiata ile çevrilidir. Bir ovum sitoplazması, üç glikoprotein ZP1, ZP2, ZP3'ten oluşan bir zona pellusida tarafından korunmaktadır ve golgi cisimciği, mitokondri, mikrovillus, endoplazmik retikulum, ve nükleus gibi organelleri içerir. Oositin homojenliği, rengi, dejenerasyon derecesi ve korona radiata hücrelerinin kat sayısı, hücrenin IVM'e uygunluğu için morfolojik kriterlerdir (Wang ve Sun, 2007).

Oositlerin maturasyonu, sitoplazmik maturasyon ve nükleer maturasyon olmak üzere iki aşamaya ayrılabilir.

Sitoplazmik maturasyon, GV'den M II safhasına kadar belirli organellerin dağılımındaki ve organizasyonundaki tüm değişiklikleri kapsar. Sitoplazmik maturasyon, mitokondrinin yeniden konumlandırılması ve kortikal granül göçü gibi nükleer maturasyon sırasında ortaya çıkan hücresel değişikliklerle ilişkilidir (Mayer ve Sirard, 2001).

Oogenezis süreci, embriyonun gelecekteki gelişimi için gerekli olan sentezlenmiş RNA'ların ve proteinlerin toplanmasıyla gelen diploten fazında en



yoğundur. Oogenezinin erken evrelerinde üretilen maternal mRNA, embriyonik gelişimin erken aşamasında eksprese edilen protein havuzu için bir matristir. Oositler, oldukça özelleştirilmiş bir hücre grubuna aittir. Oositlerin farklılaşması, oositlere özgü olan organellerinin üretimini etkiler. Oosit hücre bölünmesi, gen ekspresyon regülasyonununun spesifik mekanizmaları tarafından yönetilir (Krisher, 2004).

Bir ovumun fertilizasyon yeteneğini belirleyen birincil faktör, embriyonun uygun gelişimi ve daha sonra fetusun gelişmesidir. En yüksek yeteneğe sahip olan oositler; nükleer, sitoplazmik ve genomik olgunluğa ulaşır. Oositin sitoplazmik olgunluğu, sonraki aşamalarda embriyonun uygun fertilizasyon ve mitotik bölünmesini belirleyen moleküler ve yapısal olgunlaşmanın gelişmesinden etkilenir. Sitoplazmik maturasyonda, organel hareketi, hücre iskeleti reorganizasyonu ve moleküler olgunlaşma olmak üzere üç ana süreç görülür. *In vitro* kültürleme ile elde edilen oositler, tam gelişme potansiyeline sahip olmayabilir, dolayısıyla embriyonun anormal gelişmesine neden olur ve daha sonra gelişmekte olan fetusta kusurlar oluşturur. Hücre kültürü, epigenetik gen modifikasyonunda, protein sentezinde, sinyallerin anormal taşınmasında ve iyonlarda bozukluklara yol açabilir, bu sebepten dolayı ooplazmanın maturasyonunda bozukluklara yol açar (Coticchio ve ark., 2004).

IVF için en uygun olan oosit, preovulatör ovaryum foliküllerin büyüklerinden elde edilendir. Antral foliküllerden elde edilen oositler, genellikle M II aşamasına geçmesini önleyen sınırlı kapasitede gelişim gösterirler (Coticchio ve ark., 2004; Wu ve ark. 2006). Bununla birlikte *in vitro* şartlarda blastosist aşamasına ulaşan embriyo oranı birçok hayvan türünde düşüktür (sığırlarda yaklaşık %40 ve domuzlarda yaklaşık %20) (Moor ve ark. 1998; Wu ve ark. 2006). Gelişme aşamasında, oosit erken embriyonik aşamaların gelişimi için gerekli olan maternal mRNA ve proteinleri sentezleyerek depolar. Oosit rezerv materyali, embriyonik genomun (8-16 hücre evresi) aktivasyonu ve morula evresinden blastosiste geçiş gibi embriyo gelişiminin kritik anlarında önemli bir rol oynar ve bu süreçte erken embriyonik ölümler meydana gelebilir [Rybska ve ark., 2018].

*In vivo* ve *in vitro* olarak matüre edilen oositlerin karşılaştırmalı analizi, hücre siklusu regülasyonunda yer alan proteinlerin sayısında, proteinlerin kalitesinde,

embriyo ve fetusun gelişiminin sağlanmasında önemli farklılıklar göstermiştir. İn vivo matüre edilen oositlerde mevcut olan 9 protein, in vitro matüre edilen insan oositlerinde eksik olduğu bildirilmiştir. İn vivo ile karşılaştırıldığında in vitro matürasyonda çok daha düşük protein ekspresyonu seviyeleri, sığır oositleri ile ilgili çalışmalarda gösterilmiştir (Tinkanen ve ark., 2001).

Memeli oositlerindeki yoğun protein sentezi, maturasyon sürecinin yeniden başlamasından önce gerçekleşir. Sığır, koyun, keçi ve domuz oositleri, protein sentezi inhibitörlerinin varlığında mayozise uğramamaktadır. Transkripsiyon süreci, sadece translasyon aşamasında düzenlenmiş gen ekspresyonu ile mayotik maturasyonu sırasında tamamen durur. Bu süreç, ökaryotik başlatma faktörleri (eIFs= eukaryotic initiation factors) ve bunların düzenleyicilerinin (Hershey, 1991; Shim ve ark., 1997) fosforilasyonu ile düzenlenir. GVBD evresindeki oositler, eIF4E'nin daha önceki fosforilasyonu sonrasında, protein sentezinde 3 kat artış olduğunu bildirilirken, GV (Germinal vezikül) evresindeki hücrelerin düşük düzeyde bir translasyona sahip olduğu gösterilmiştir. M II aşamasında, 4E-BPI bağlayıcı protein ile potansiyel inhibitörü olan eIF4E'nin bloke edilmesine bağlı olarak, protein ekspresyonunun inhibisyonu bildirilmiştir (Rybska ve ark., 2018).

Nükleer maturasyon, Mayoz I'in diploten evresinden M II evresine kadar kromatin modifikasyonunu yansıtan bir dizi fizyolojik olay olarak tanımlanabilir (Kumar, 2007). Bir başka şekilde tanımlanacak olursa, oosit nükleusunun GV'den M II evresine ilerlemesini ifade eder (Mayes, 2002). Bu aşama, germinal vezikül yıkılması, kromozomların yoğunlaşması, M I (Metafaz I) iğ oluşumu, birinci polar body'nin perivitellin boşluğa atılması ile homolog kromozomların ayrılması, M II evresine geçilmesini ve bu evrenin bloke edilmesini içerir (Kubelka ve ark., 1988; Mayes, 2002; Akyol, 2006).

Nükleer zar katlanmaya başlar, nükleer gözenekler kaybolur ve daha sonra nükleer membran parçalanır ve hızla kaybolur (Szollosi ve ark., 1972). Sığır oositleri, nükleer maturasyonu tamamlayabilmesi için 24 saatlik bir süreye ihtiyaç duyar (Sirard ve ark., 1989). Nükleer maturasyon, in vivo ve in vitro aynı modeli izlediği anlaşılmaktadır (Hyttel ve ark., 1986). Nükleer maturasyon, protein sentezi modellerinde değişiklikler içerir (Hunter ve Moor, 1987). GV aşamasında kalan

oositler, devamlı protein sentez modellerine sahip iken, sığır oositleri, in vitro ve in vivo olarak GVBD'den sonra protein sentezi modellerinde belirgin değişikliklere uğrar (Kastrop ve ark., 1990; Kastrop ve ark., 1991).

IVM için kullanılan maturasyon medyumları, hem oositin maturasyonunu hem de embriyo gelişimini etkilemektedir. Bu yüzden maturasyon medyumları yardımcı üreme tekniklerinde önemli bir yer almaktadır (Akyol, 2006; Gordon, 2003). İmmatür sığır oositlerini matüre etmek için kullanılan, basit ve kompleks olarak sınıflandırılan maturasyon medyumları mevcuttur. Basit medyumlar, genellikle piruvat, laktat ve glikoz eklenen, temel fizyolojik tuzları içeren bikarbonat tamponlu sistemlerdir (Abdoon, 2003; Akyol, 2006; Gordon, 2003). Basit medyumun çeşitli şekilleri arasındaki temel farklılıklar, iyon konsantrasyonları ve enerji kaynaklarının seviyelerindeki farklılıklara dayanır. Basit medyumlara genellikle eser miktarda antibiyotik (penisilin, streptomisin, gentamisin), serum veya albümin eklenir (Gordon, 2003). Kompleks medyumlar, basit medyumların temel bileşenlerinin içine serumda bulunan konsantrasyonlarda aminoasit, vitamin, pürin ve diğer maddelerin eklenmesiyle oluşturulur. Doku kültürü medyumunu-199 (TCM 199), sığır oositlerinin IVM'i için en yaygın kullanılan medyumdur (Akyol, 2006; Gordon, 2003; Kumar, 2007). Kompleks maturasyon medyumlarına verilecek diğer bir örnekler, Ham's F-10 ve Menezo-B2 medyumlarıdır (Akyol, 2006; Liu ve ark., 1991).

Maturasyon medyumuna FBS (Chen ve ark., 2014; Sripunya ve ark., 2014), FCS (Li ve ark., 2002; Çetin, 2004), estrus buffalo serum (EBS; Bethapudi, 2017), arı sütü (Aksu, 2010), L-glutamin (Çetin, 2004), Na-piruvat (Çetin, 2004), östradiol-17 $\beta$  (Chen ve ark., 2014; Sripunya ve ark., 2014; Matsuo ve ark., 2017), FSH (Chen ve ark., 2014; Sripunya ve ark., 2014; Yu ve ark., 2016), LH (Chen ve ark., 2014; Yu ve ark., 2016), hCG (Sripunya ve ark., 2014), folltropin (Çetin, 2004; Macun, 2004), progesteron (Matsuo ve ark., 2017), sistein (Yu ve ark., 2016), sisteamin (Sripunya ve ark., 2014), foliküler sıvı (Yu ve ark., 2016), İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (Topuzoğlu, 2011), Epidermal büyüme faktörü (Topuzoğlu, 2011; Chen ve ark., 2014; Sripunya ve ark., 2014), at hipofiz ekstraktı (equine pituitary extract) (Hurt ve

ark., 2000), antibiyotik (Çetin, 2004; Bethapudi, 2017) gibi katkı maddeleri katılabilmektedir.

Oositlerden *in vitro* koşullarda etkili şekilde preimplantasyon sığır embriyolarının üretimini sağlamak, embriyo transferi ve temel bilimsel araştırmalar için *in vitro* maturasyon ve *in vitro* fertilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi önemlidir (Matsuo ve ark., 2017). *In vitro* maturasyona etki eden faktörler, oosit vericisinin fizyolojik durumu, östrüs siklusu ve foliküler dalgalanma, folikül büyüklüğü, kumulus oosit kompleksi, oosit kalitesi, maturasyon süresi (Gordon, 2003), maturasyon medyumlarının pH ve osmotik değerleri (Gordon, 2003), maturasyon medyumuna eklenen katkı maddeleri (Kim ve ark., 1993; Takahashi ve First, 1992) ve hormonlar (Beker ve ark., 2002; Fukui ve ark., 1982; Mingoti ve ark., 2002; Silva ve Knight, 2000), sıcaklık (Lenz ve ark., 1983; Matsuo ve ark., 2017), nem ve çevresel gaz bileşimleridir (Akyol, 2006; Gordon, 2003; Matsuo ve ark., 2017).

Ovaryum foliküllerinden elde edilen ve IVM'e maruz bırakılan oositlerin gelişimsel yeterlilik düzeyinin düşük olması, oositlerin kriyorezistans ve embriyoların daha ileri gelişim kabiliyetini etkileyebilen, son derece önemli olan moleküler/hücrel faktörlerden biridir. Hayvanların ve insanların üremesinde iyi kalite embriyo gelişimi ve döl sağlması açısından, *in vivo* maturasyona kıyasla, *in vitro* matüre edilen oositlerde bazı bozulmaların meydana geldiği gözlemlenmiştir (Eppig ve ark., 2009; Nagai, 2001; Rizos ve ark., 2002). Sığır oositleri folikül büyümesi sırasında gelişmeye yönelik yetenek kazanır ve yaklaşık 115 µm'lik bir çapa sahip olan oosit, dominant bir folikülde tamamen yetkin hale gelir (Hendricksen ve ark., 2000; Hyttel ve ark., 1997). Uygun bir maturasyon, fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim için oosite izin veren optimum gelişimsel yetkinlik edinme süreci, kapasitasyon olarak bilinir (Hyttel ve ark., 1997). Embriyonik genomun aktivasyonuna kadar erken embriyonun uygun gelişimine karar verecek olan maternal RNA'nın yeterli miktarda tamamlanması ve transkripsiyon ile sonlanması, oosit kapasitasyonunu etkileyen önemli faktörlerden biri olduğuna inanılmaktadır. Diğer faktörler arasında heterojen RNA poliadenilasyonunun uygun bir seviyesi (Brevini Gandolfi ve Gandolfi, 2001) ve cAMP birikimi (Luciano ve ark., 1999), oosit kapasitasyonunu etkileyen önemli faktörler olduğu düşünülmüştür. Post-

mortem ovaryumların uzun süreli (4 saate kadar) depolanması (Blondin ve ark., 1997) ya da spesifik hücre döngüsü inhibitörleri ile oosit maturasyonunun inhibisyonu, oosit yetkinliğinin daha yüksek seviyeye ulaşmasında yararlı olabileceği belirlenmiştir. İlk etkinin mekanizmaları belirsiz kalsa da maturasyon progresyonunun geçici inhibisyonu, oositlerin maternal RNA sentezini tamamlamasına imkan sağlar, aksi halde maternal RNA sentezi, maturasyon destekleyici faktör (MPF= Maturation Promoting Factor) aktivitesindeki bir artışla erkenden durdurulduğu varsayılmıştır (Hashimoto ve ark., 2002; Lonergan ve ark., 1997; Ponderato ve ark., 2001).

Günümüzde, sadece bir dizi hücre döngüsü inhibitörleri bilinmektedir. Bu inhibitörlerin bazıları, protein sentezi inhibisyonu (sikloheksimid) (Lonergan ve ark., 1997) veya protein fosforilasyonu ile mayozun kaldığı yerden devam etmesini engelleyebilir, böylece p34cdc2/siklin B kompleksinin (MPF) (6-dimetilaminopurin) inaktif formunu korur (Avery ve ark., 1998). Bununla birlikte, bu inhibitörler aracılığıyla hücre döngü inhibisyonu etkinliğinin gerçekleşmesi veya gerçekleşmemiş olması tartışmalıdır. Daha yakın zamanlarda, daha spesifik ve görünüşte zararsız inhibitörlerin etkili bir kullanımı tarif edilmiştir. Roskovitin (Mermillod ve ark., 2000; Ponderato ve ark., 2001) veya butirolakton I (Lonergan ve ark., 2000; Ponderato ve ark., 2001), G1/S veya G2/M aşamaları arasındaki geçişte hücre döngüsünü durdurabilen, spesifik cdc2- ve cdk2- kinaz inhibitörleridir. Mermillod ve ark. (2000), roskovitin ile 24 saatlik inkübasyondan sonra sığır oositlerinin %80'ini GV aşamasında durduğunu ve roskovitin olmaksızın 24 saat maturasyona tabi tutulan oositlerin %89'unun metafaz II'ye ilerlediğini bildirmiştir. Bununla birlikte bu oositlerin yaklaşık %40'ı IVF sonrası blastosist aşamasına kadar gelişmiştir.

GDF9, bir dereceye kadar kemik morfogenetik protein 15 (BMP15= bone morphogenetic protein 15) ve muhtemelen diğerleri gibi oositin salgılanan faktörler (OSF= Oocyte-secreted factors), folikülogenezis ve dişi fertilitesi için gerekli bulunmuştur (Gilchrist, 2011). Ek olarak, BMP15 ve GDF9 genleri, KOK içindeki anti-apoptotik faktörü lokalize olacak şekilde arttırarak kumulus hücrelerinin apoptozunu önler (Hussein ve ark., 2005). GDF9 ve BMP15, sırasıyla reseptör benzeri kinaz 5 ve 6'yı (ALK5 veya TGFBR1, ALK6) ve ortak bir reseptör olan

kemik morfojenetik protein reseptörü II'yi (BMP2) aktive eden spesifik reseptörler aracılığıyla sinyal üretir. Her iki reseptör, oositlerde granuloza ve teka hücrelerinde ekspresyona uğrar (Juengel ve ark., 2004; Wilson ve ark., 2001).

M-II aşamasındaki manda oositlerinin en yüksek yüzdesi in vitro kültürden 24 saat sonra ortaya çıkar ve sonrasında nükleer materyalin dejenerasyonu başlar (Yadav ve ark., 1997). Buffalo oositlerinin in vitro olgunlaşması için, 10-15'lik KOK'ların grupları, %90-95 bağıl nem ile %5 CO<sub>2</sub>'li hava atmosferinde 38.5 ile 39°C'de steril parafin yağı altında 50-100 µl'lik IVM medyumunu damlacıkları içinde 22-24 saat boyunca kültürlenir (Chauhan ve ark., 1996).

Sığır oositlerinin in vitro olarak blastosist'e gelişim oranı hala in vivo'dan daha düşüktür (Leibfried-Rutledge ve ark., 1987; Rizos ve ark., 2002). Son zamanlarda, fosfodiesteraz inhibitörü ve adenilat siklaz aktivatörü (cAMP aracılı pre-IVM) kullanılarak simüle edilmiş fizyolojik oosit maturasyon (SPOM= simulated physiological oocyte maturation) sistemini, in vivo sığır oosit maturasyonunun bazı özelliklerini taklit ettiği bildirilmiştir (Albuz ve ark., 2010). Bununla birlikte, sığır embriyo üretimi üzerine SPOM sisteminin etkinliği belirlenmemiştir (Guimaraes ve ark., 2015).

Preovulatör folliküllerde steroid hormon konsantrasyonundaki değişimin oosit maturasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Dieleman ve ark., 1983; Moor ve ark., 1980; Wrenzycki ve Stinshoff, 2013). Ovulasyon, sığırlarda luteinize edici hormon (LH) pikinden 24±1.4 saat sonra gerçekleşir (Dieleman ve ark., 1983). Sığırlardaki foliküler sıvının estradiol-17 β (E2) konsantrasyonu, LH pikinden 0-5 saat önce 798-1648 ng ml<sup>-1</sup>'den LH pikinden 6-15 saat sonra 180-256 ng ml<sup>-1</sup>'e düştüğü ve LH pikinden 20 ila 23 saat sonra 80- 125 ng ml<sup>-1</sup> olduğu ovulasyon hemen önce tahmin edilmiştir (Dieleman ve ark., 1983; Fortune ve Hansel, 1985; Hansen ve ark., 1988; Li ve ark., 2007). Eş zamanlı olarak, sığırlardaki folliküler sıvının progesteron (P4) konsantrasyonu, LH pikinden 0-5 saat önce 50-122 ng ml<sup>-1</sup>'den, LH pikinden 6-15 saat sonra 41-150 ng ml<sup>-1</sup>'e, ve LH pikinden 20 ila 23 saat sonra 280-475'e artış göstermiştir (Dieleman ve ark., 1983; Fortune ve Hansel, 1985; Hansen ve ark., 1988; Li ve ark., 2007).

Birçok çalışmada, IVM medyumuna  $1000 \text{ ng ml}^{-1}$  E2'nin eklenmesi, sığır oositlerinin maturasyonunun desteklenmesi ve mayozun yeniden başlatılması için etkili olmuştur (Beker ve ark., 2002; Fukui ve ark., 1982; Fukushima ve Fukui, 1985; Younis ve ark., 1989). P4,  $50\text{-}5000 \text{ ng ml}^{-1}$ 'lik bir konsantrasyonda sığır oositleri için IVM medyumuna eklenmiş ve çeşitli sonuçlar embriyo üretiminde bildirilmiştir (Aparicio ve ark., 2011; Silva ve Knight, 2000). IVM medyumunda P4 konsantrasyonu veya preovulatör foliküler sıvıdaki E2 ve P4 konsantrasyonları önceki çalışmalarda medyum hazırlanırken dikkate alınmamıştır. Üç aşamalı IVM kültür sistemi, domuz embriyo üretiminde *in vivo* olarak gözlemlenen hormonal değişiklikleri taklit etmek için geliştirilmiştir (Kawashima ve ark., 2008). Sığır IVM kültürünün süresi, domuz IVM kültürü süresinin yaklaşık yarısı kadardır. Buna rağmen, Matsuo ve ark. (2017), domuzlarda kullanılan kültür sisteminin benzerini, sığır IVM'i için de uygulanabileceğini düşünmüştür.

Matsuo ve ark. (2017), *in vitro* sığır embriyo üretiminde preovulatör foliküllerdeki estradiol-17  $\beta$  (E2) ve progesteron (P4) konsantrasyonlarını taklit eden üç aşamalı *in vitro* maturasyon (IVM) kültür sisteminin etkisini araştırmıştır. KOK'lar, mezbahanedan elde edilen sığır ovaryumlarındaki foliküllerden (2 ila 8 mm çapında) toplanmıştır. IVM için, KOK'lar üç aşamalı bir sistemde 22 saat süreyle kültürlenmiştir. 1. grup olan EP grubunda; KOK'lar 5 saat boyunca  $700 \text{ ng ml}^{-1}$  E2 ve  $50 \text{ ng ml}^{-1}$  P4 içeren medyum 199 içinde, ardından 11 saat boyunca  $150 \text{ ng ml}^{-1}$  E2 ve  $150 \text{ ng ml}^{-1}$  P4 içeren medyumda ve daha sonra 6 saat boyunca  $20 \text{ ng ml}^{-1}$  E2 ve  $300 \text{ ng ml}^{-1}$  P4 içeren medyumda kültürlenmiştir. 2. grup olan E grubunda; KOK'lar 5 saat boyunca  $700 \text{ ng ml}^{-1}$  E2 içeren medyumda, ardından 11 saat boyunca  $150 \text{ ng ml}^{-1}$  E2 içeren medyumda ve daha sonra 6 saat boyunca  $20 \text{ ng ml}^{-1}$  E2 içeren medyumda kültürlenmiştir. 3. grup olan P grubunda; KOK'lar 5 saat boyunca  $50 \text{ ng ml}^{-1}$  P4 içeren medyumda, ardından 11 saat boyunca  $150 \text{ ng ml}^{-1}$  P4 içeren medyumda ve daha sonra 6 saat boyunca  $300 \text{ ng ml}^{-1}$  P4 içeren medyumda kültürlenmiştir. 4. grup olan kontrol grubunda; KOK'lar 22 saat boyunca  $1000 \text{ ng ml}^{-1}$  E2 içeren ortamda kültürlenmiştir. IVM'den sonra, KOK'lar sperm ile birlikte inkübe edilmiş ve kültürlenmiştir. Fertilizasyondan 48 saat sonra, embriyoların klivaj oranı gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Fertilizasyondan 192 saat sonra, EP grubunun blastosist oluşum oranı, diğer gruplardan anlamlı derecede daha

yüksek bulunmuştur. Blastosistlerin toplam hücre sayısı, gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Çalışmanın sonuç bulguları, preovulatör folliküler sıvıdaki E2 ve P4 konsantrasyonlarının geçici değişimlerini taklit eden sığır oositlerinin üç aşamalı IVM kültür sisteminin in vitro embriyoların gelişimsel potansiyelini arttırdığını ortaya koymaktadır.

### **2.7.1. Oositlerde Maturasyon Kriterleri**

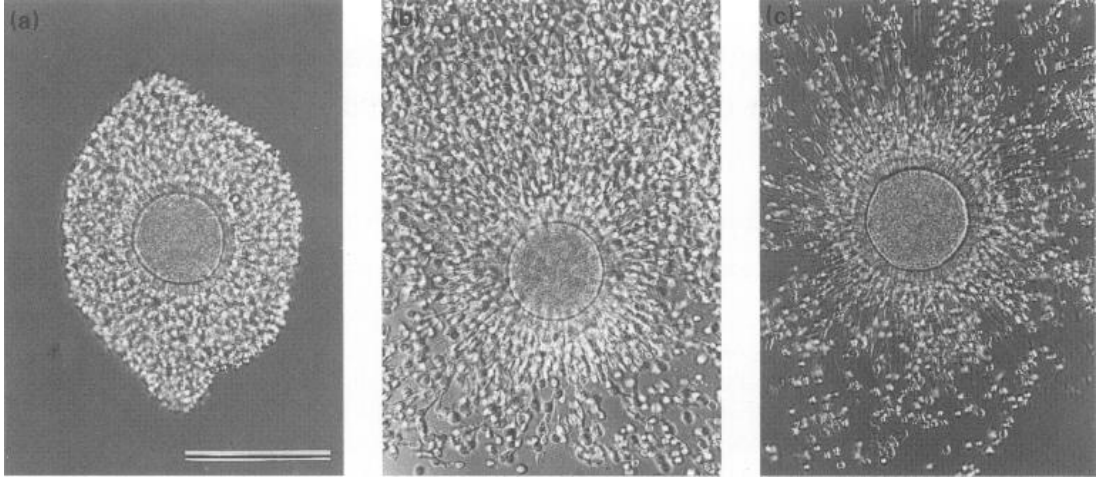
Sığır oositleri in vitro maturasyona tabi tutulduktan sonra oositi çevreleyen kumulus hücreleri genişler. Bu durum kumulus ekspansiyonu olarak adlandırılır (Gordon, 2003). Kumulus ekspansiyonu gösteren oositlerin oranları, in vitro matürasyonun sonunda belirlenmektedir. Kumulus ekspansiyonunun derecesi, Kobayashi ve ark. (1994) tarafından kumulus ooforusun morfolojisi ile aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir:

0 Derece: Kumulus ekspansiyon görülmeyen.

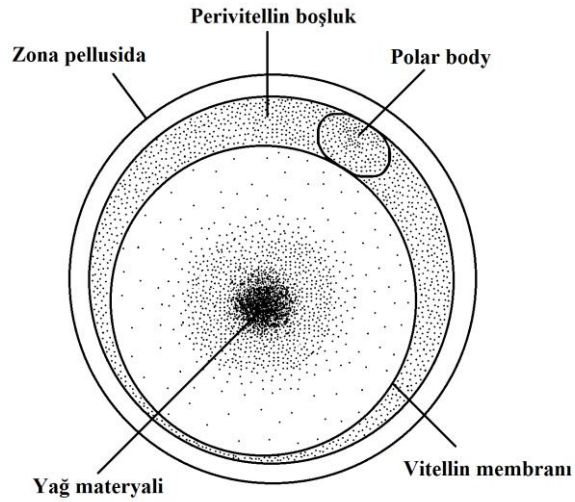
1 Derece: Kumulus hücreleri homojen olmayan şekilde yayılan ve hala kümelenmiş hücreler görülen.

2 Derece: Kumulus hücreleri homojen olarak yayılan ve kümelenmiş hücreler görülmeyen. Bu üç kategoride in vitro matüre edilen kumulus-oosit komplekslerinin tipik morfolojisi şekil 2.13'de gösterilmiştir (Kobayashi ve ark., 1994).





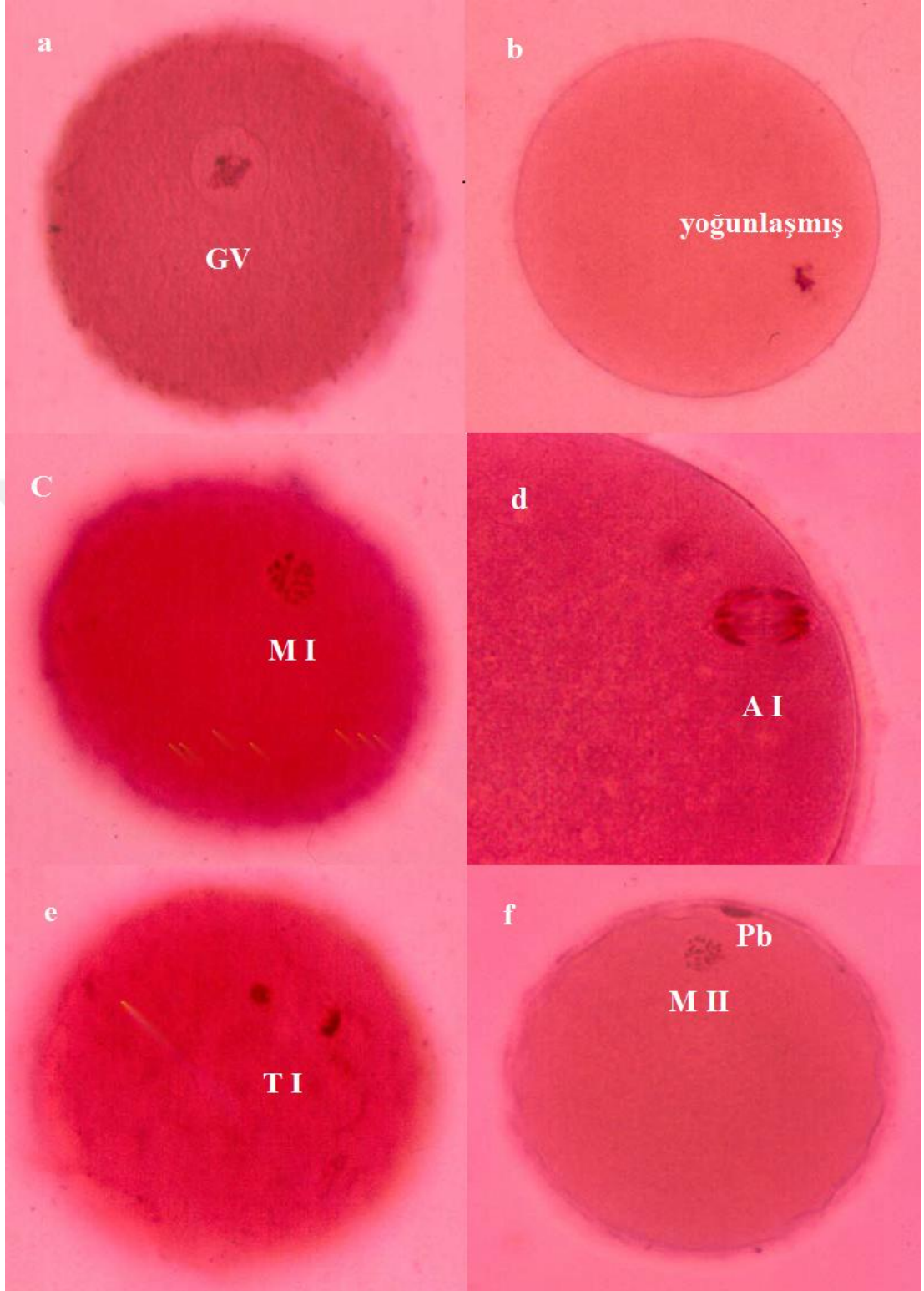
**Şekil 2.13.** Üç farklı derecede kumulus ekspansiyonu gösteren sığır kumulus oosit kompleksleri, (a) 0 Derece: Taze toplanmış kumulus oosit komplekslerine kıyasla morfolojik bir değişiklik gözlenmeyen, (b) I Derece: Kumulus ooforusu biraz genişleyen fakat hala hücrelerin birbiriyle bağlanması nispeten sıkı olan ve kümelenmiş hücreler gözlenen, (c) 2 Derece: Kumulus ooforusu genişlemiş ve kumulus hücreleri homojen olarak yayılmıştır. Ölçek çubuğu 200 mikronu temsil etmektedir (Kobayashi ve ark., 1994).



**Şekil 2.14.** M II aşamasındaki sığır oositinin şematığı (Gordon, 2003).

Matüre olan oositin perivitellin boşluğunda artış meydana gelmektedir. Birinci polar body perivitellin boşluğunun içine atılır (Şekil 2.14) ve M II iğ vitellin membranının yüzeyine teğettir (Gordon, 2003). Sitoplazmik maturasyon, normal bir şekilde oositin fertilizasyona uğraması, klivaj ve blastosist aşamasına gelişmesi,

matür oositin yeteneği olarak değerlendirilmektedir. Sitoplazmik maturasyonu değerlendirmek için dikkat edilecek diğer morfolojik parametreler; kumulus hücrelerinin genişlemesi, polar body'nin perivitellin boşluğa atılması ve artan perivitellin boşluktur (Mayes, 2002). İlk polar body görülmesi, her zaman M II'nin kromozomal konfigürasyonuna sahip olan oositlerin kanıtı olmayabilir ve bu durum bir anormallik anlamına gelmemektedir (Gordon, 2003). Boyama ile yapılan değerlendirmelerde kromozomal durumu M II'yi gösteren oositlerin %50'sinde polar body'nin görüldüğü bildirilmektedir. Bu yüzden polar body'nin perivitellin boşluğa atılmaması nükleer maturasyonun oluşmadığı anlamına gelmemektedir. Nükleer maturasyonu daha doğru bir şekilde belirlemek için boyama tekniklerinden yararlanılabilir (Çetin, 2004; Gordon, 2003). Mayes (2002) tarafından boyanan oositlerin nükleer maturasyon aşamaları şekil 2.15'de gösterilmiştir. Oositlerin canlılığı ve kromozom konfigürasyonu, Hoechst 33342 boyası kullanılarak değerlendirilmektedir. Oositlerin kromozom konfigürasyonu ve nükleer maturasyonunu değerlendirmek için aseto-orsein boyası kullanılmaktadır (Hurt ve ark., 2000). Yapılan araştırmalarda maturasyon süreci, kumulus hücrelerinin soyulmasının ardından M II evresindeki kromozomlarının varlığını gözlemlemek için Giemsa (Chauhan ve ark., 1996; Das ve ark., 1997) veya aseto-orsein (Madan ve ark., 1994) boyasıyla boyanarak değerlendirilmiştir (Kumar, 2007). Wit ve Kruip (2001), aseto-orsein boyasını, oositlerde germinal vezikülün olup olmadığını değerlendirmede ve embriyo gelişimini değerlendirmek amacıyla embriyodaki çekirdeklerin sayımında kullanmıştır. Zeron ve ark. (1999), aseto-orsein boyasını fertilize edilen oositlerdeki dişi ve erkek pronükleusu ve 2. polar body'yi değerlendirmek için kullanmıştır. Kortikal granüllerin dağılımı, floresan-isisyanat boyası kullanılarak değerlendirilebilir (Hurt ve ark., 2000). Kortikal granüller matür oositlerde periferde toplanır iken, immatür oositlerde rastgele bir dağılım göstermektedir (Hurt ve ark., 2000). Çetin'in (2004) bildirdiğine göre; Xu ve arkadaşları, maturasyonun tek gerçek güvenilir kriterinin canlı bir yavrunun doğumu olduğunu 1986 yılında rapor etmiştir.



**Şekil 2.15.** Sığır oositlerinin nükleer maturasyonun aşamaları (Mayes, 2002).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, 93773921-050.99 sayılı yerel etik kurulu onayı ile mesleki ve etik değerler ve biyogüvenlik önlemleri çerçevesinde yürütülerek tamamlandı.

#### 3.1. Ovaryumların Toplanması ve Laboratuvara Taşınması

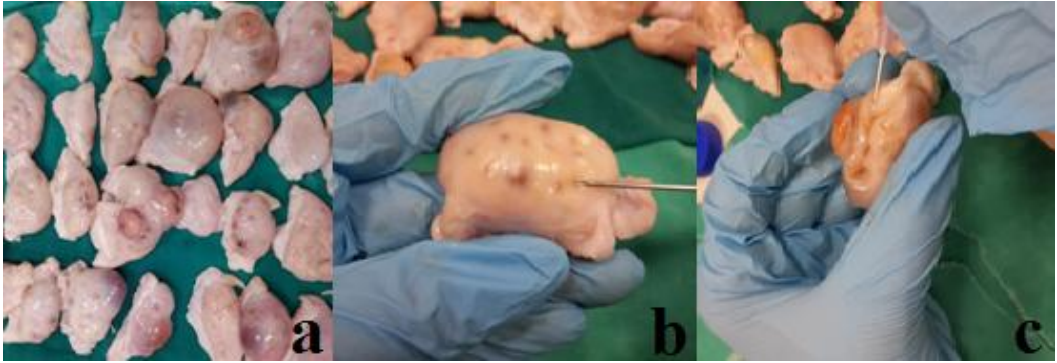
Çalışmada Burdur ilinde bulunan mezbahannede kesilen 139 holstein ırkı ve melezi ineklerden elde edilen 277 ovaryumlar kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce 1 lt'lik mavi kapaklı cam şişe içerisinde %0.9'luk serum fizyolojik hazırlandı. Hazırlanan serum fizyolojik, filtrasyon düzeneğinden geçirilerek steril cam şişeye aktarıldı ve +4°C'de süre olmaksızın saklandı. Ovaryumları laboratuvara taşımak için çalışmadan 1 gün önce 1 lt'lik %0.9'luk serum fizyolojik içine 1 ml gentamisin eklenerek taşıma medyumu (Ek-1) hazırlandı. Mezbahaneye ulaşıldığında taşıma medyumunu içeren 1 lt'lik mavi kapaklı cam şişe, sıcak su içeren kova içine konuldu. Hayvanların kesim işlemi başladığında termos, içine taşıma medyumu ilave edilerek hazırlandı (Şekil 3.1. a). Ovaryumlar bıçak ile kesilerek kesilen hayvanların üreme organlarından ayrıldı. Ayrılan ovaryumlar taşıma medyumuyla yıkanarak kandan arındırıldı ve termos içine konuldu. Mezbahaneden alınan ovaryumlar yeterli sayıya ulaşıncaya kadar 25-30°C'deki taşıma medyumu içeren termos içinde bekletildi (Şekil 3.1. b). Termos içindeki ovaryumlar, kesim başladıktan sonra 2-3 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.



**Şekil 3.1.** Hazırlanan taşıma medyumunun termos içine aktarılması (a) ve termos içinde bekletilen ovaryumlar (b).

### 3.2. Foliküllerin Aspirasyonu ve Oositlerin Seleksiyonu

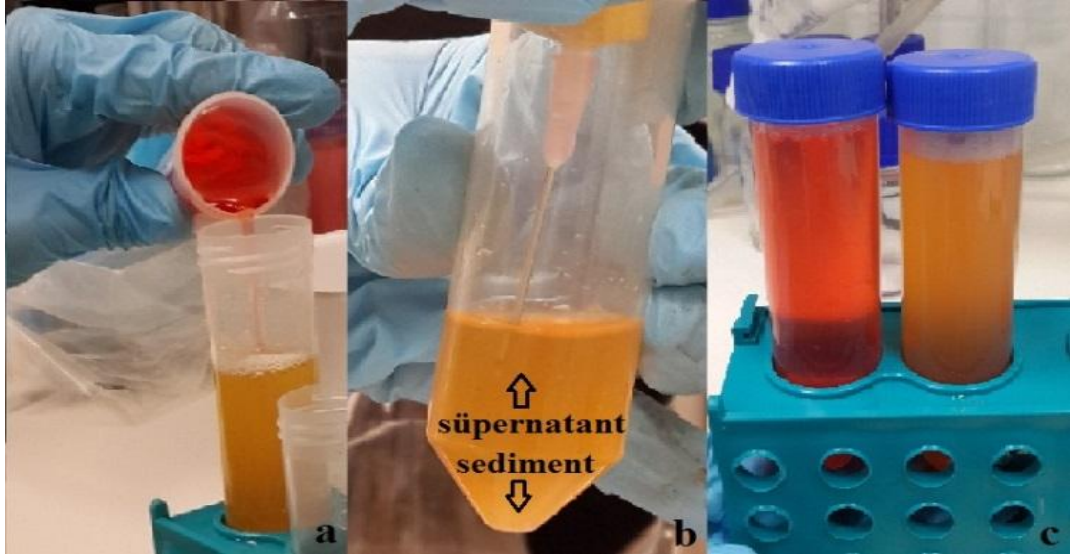
Çalışma gününden 1 gün öncesinde hazırlanarak buzdolabında bekletilen %1 CS içeren TCM199 medyumu (manipülasyon medyumu), çalışmadan önce 38.5°C'deki etüv içerisine konularak ısınması sağlandı. Ovaryumlar steril %0.9'lük serum fizyolojik içinde yıkandı ve steril serviyet ile kurularak steril serviyet üzerine yerleştirildi (Şekil 3.2. a). Aspirasyon işlemi öncesinde kullanılacak olan 10 ml'lik enjektör ve 50 ml'lik konik uçlu tüplerin içlerinde herhangi bir toksik madde kalmaması için manipülasyon medyumuyla (Ek-2) yıkandı. Ovaryumların üzerindeki 2 – 6 mm çapındaki foliküller 10 ml hacimli, 18 G iğneli steril enjektör ile aspire edildi. Aspirasyon öncesi ilk olarak 50 ml'lik steril konik uçlu tüp içine 1 ml manipülasyon medyumu bırakıldı ve enjektör içine 0.5 ml manipülasyon medyumu çekilerek foliküller aspire edilmeye başlandı. Aspirasyon işleminde enjektör iğnesinin açık ucu yukarıya bakacak şekilde (Şekil 3.2. b) ovaryum korteksinden girdikten sonra içeriden çıkmadan yapılabildiği kadar çok aspirasyon yapıldı (Şekil 3.2. c). Aspire edilen folikül sıvısı 50 ml'lik steril konik uçlu tüpün kenarından yavaş bir şekilde boşaltıldı. Enjektördeki follikül sıvısının tüp içine çok hızlı bir şekilde boşaltılması, oositlerin üzerindeki kumulus hücrelerinin soyulmasına neden olabilmektedir.



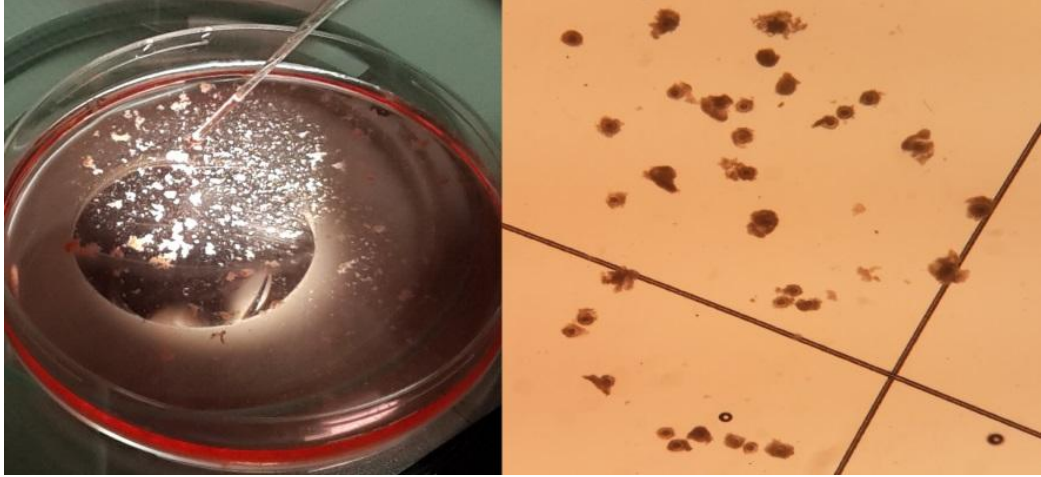
**Şekil 3.2.** Serviyet üzerine sıralanan ovaryumlar (a), aspirasyon işleminde iğnenin pozisyonu (b) ve ovaryumlardaki foliküllerin aspirasyon işlemi (c).

Aspirasyon işlemi bitince tüpün üzerinde kalan kısım, manipülasyon medyumu ile tamamlandı (Şekil 3.3. a) ve 10 dk bekletilerek oositlerin yıkanması işlemine geçildi. Tüpün dip kısmında kalan 1 ml'lik sediment kısmına kadar tüpün

üzerindeki süpernatant kısım enjektör yardımıyla aspire edilerek uzaklaştırıldı (Şekil 3.3. b) ve üzerine tekrar manipülasyon medyumunu eklendi. Oositleri yıkama işlemi 3 defa yapıldı. Son kez üstteki süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra altta kalan 1ml'lik sediment kısmı, 90 mm'lik petri kabının içerisine aktarıldı. Tüp içerisinde oosit kalabileceğinden dolayı tüpün içi 3 kez manipülasyon medyumuyla yıkanarak aynı petri kabının içerisine aktarıldı. Oositler yıkandıkça oositlerin bulunduğu manipülasyon medyumunun rengi bulanıkken berraklaşır (Şekil 3.3. c). Yıkanan oositler, berrak renkli manipülasyon medyumunda her ne kadar rahat görülüp bulunsa da doku parçacıklarından arındırılamaz. Bu yüzden hiç vakit kaybedilmeden oositler, bistüri yardımıyla tabanı dış taraftan 1 cm aralıklarla çizilmiş 60 ml'lik petri kabı içerisine stereomikroskop (OLYMPUS) altında aktarıldı (Şekil 3.4.).



**Şekil 3.3.** Aspirasyon sonrasında tüpün manipülasyon medyumunu ile tamamlanması (a), yıkama işlemindeki süpernatantın enjektör ile çekilerek uzaklaştırılması (b), oositlerin yıkama öncesi (sağ taraftaki) ve yıkama sonrası (sol taraftaki) tüpteki görünümleri (c).



**Şekil 3.4.** 90 ml'lik petri içindeki oositlerin aranması (sol) ve tabanı dış taraftan 1 cm aralıkla çizilmiş 60 ml'lik petri içindeki oositlerin sayımı (sağ).

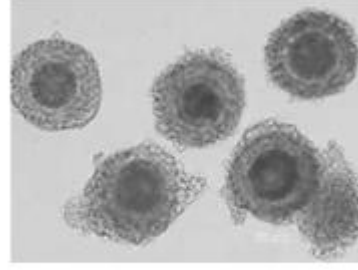
İmmatür oositler A, B, C ve D kalite olarak 4 gruba ayrıldı. A ve B kalitedeki oositler kaliteli, C ve D kalitedeki oositler kalitesiz oositler olarak kabul edildi. A kalitedeki oositler, çalışmaya dahil edildi. B, C ve D kalitedeki oositler ise çalışmaya dahil edilmedi. Oosit kaliteleri (Şekil 3.5; Anonim, 2007);

A Kalite: Kumulus hücreleri tüm zona pellusida üzerinde 3 veya daha fazla katlı olarak görülmektedir.

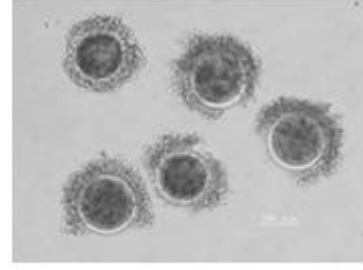
B Kalite: Kumulus hücreleri 2 veya daha az katlı olarak zona pellusidanın 1/3'ünden fazlasını kaplamaktadır.

C Kalite: Oosit tamamen çıplaktır veya B kalitedeki oositlerden daha az kumulus hücrelerine sahiptir.

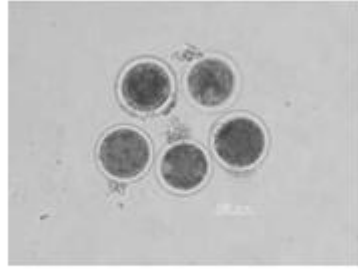
D Kalite: Kumulus hücreleri şişmiş veya örümcek ağı görünümündedir.



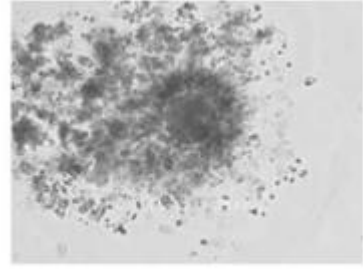
A Kalite



B Kalite



C Kalite



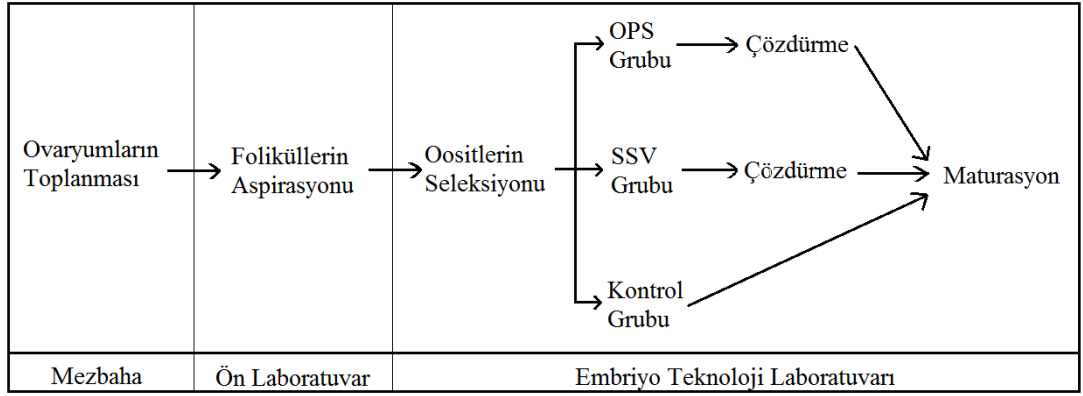
D Kalite

**Şekil 3.5.** Oositlerin sınıflandırılması (Anonim, 2007).

### 3.3. Deney Düzenegi

Çalışma 2 farklı vitrifikasyon yöntemi (OPS grubu ve SSV grubu) ve bir kontrol grubu olmak üzere 3 farklı gruptan oluşturuldu. Çalışma grupları, kullanılan vitrifikasyon yöntemlerine göre oluşturuldu. OPS grubu olan oositler OPS vitrifikasyon yöntemiyle, SSV grubu olan oositler SSV vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözdürüldükten sonra IVM'e tabi tutulurken, kontrol grubunda olan oositler vitrifiye edilmeksizin doğrudan IVM'e tabi tutuldu. Çalışma deney düzeneginin şematiği şekil 3.6'da gösterildi.





**Şekil 3.6.** Çalışma deney düzeneğinin şematığı.

Çalışmanın güvenilirliği açısından, vitrifikasyon gruplarının her ikisi de aynı günlerde, aynı ana medyunda vitrifiye edilerek en az 3 hafta boyunca sıvı azot tankında muhafaza edildi. Vitrifiye edilen gruplar aynı günlerde, aynı ana medyunda çözdürülüp, kontrol grubu da dahil olmak üzere 3 grup IVM'e tabi tutuldu. IVM sonrasında oositler, kumulus ekspansiyonu yönünden değerlendirildikten sonra kumulus hücreleri soyularak polar body yönünden değerlendirildi. Ayrıca vitrifiye edilen gruplar donma hasarına karşı incelendi. Veriler laboratuvar kayıt formuna (Ek-14) işlendi.

### 3.3.1. Medyumların Hazırlanması

Çalışmada ana medyum olarak hidroksietil piperazine-N-2-ethanesulfonik asit (HEPES) içeren TCM199 kullanıldı. TCM199 medyumunu, HEPES ve bikarbonat içermesinden dolayı atmosferik ortamda ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda güvenilir şekilde kullanılmaktadır. Toz halinde satılan TCM199 medyumunu, firma tarafından bildirilen çözdürme prosedürüne göre steril ultra saf su ile çözdürüldü. Oda sıcaklığında bulunan medyumun pH değeri 6.8±0.3, osmolaritesi 286 mOsm idi. Medyum, laminar flow kabin (HERA guard, Heraeus) altında filtrasyon düzeneğinden geçirilerek steril 100 ml'lik mavi kapaklı cam şişelere aktarıldı. Medyumun hava ile uzun süre teması, medyumun pH'sını değiştireceğinden dolayı medyumun şişelere aktarma işlemi olabildiğince kısa sürede yapıldı. Cam şişelerin üzerine TCM199 ve tarih yazıldı. Hazırlanan medyum, karanlıkta ve 2-8°C'de saklanması gerektiğinden dolayı şişeler alüminyum folyo ile sarılarak buzdolabında 1 ay boyunca saklandı.

Oositlerin vitrifikasyonu, çözdürülmesi ve maturasyonu için ayrı medyumlar hazırlandı.

#### **-Vitrifikasyon Medyumları**

Vitrifikasyon medyumları çalışmadan 1 gün önce hazırlanarak buzdolabında dinlendirildi ve çalışma günü buzdolabından çıkartılıp oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.

OPS grubunda, OPS vitrifikasyon solüsyonu 1 (OVS 1) ve OPS vitrifikasyon solüsyonu 2 (OVS 2) olmak üzere 2 farklı medyum kullanıldı. OVS 1 (Ek 3) olarak %20 CS, %10 EG, %10 DMSO içeren TCM199 medyumunu kullanıldı. OVS 2 (Ek 4) olarak %20 CS, %20 EG, %20 DMSO ve 0.5 M süktroz içeren TCM199 medyumunu kullanıldı.

SSV grubunda, SSV vitrifikasyon solüsyonu 1 (SVS 1) ve SSV vitrifikasyon solüsyonu 2 (SVS 2) olmak üzere 2 farklı medyum kullanıldı. SVS 1 (Ek 5) olarak %20 CS ve %4 EG içeren TCM199 medyumunu kullanıldı. SVS 2 (Ek 6) olarak %20 CS, %35 EG, %5 PVP ve 0.4 M trehaloz içeren TCM199 medyumunu kullanıldı.

#### **- Çözdürme Medyumları**

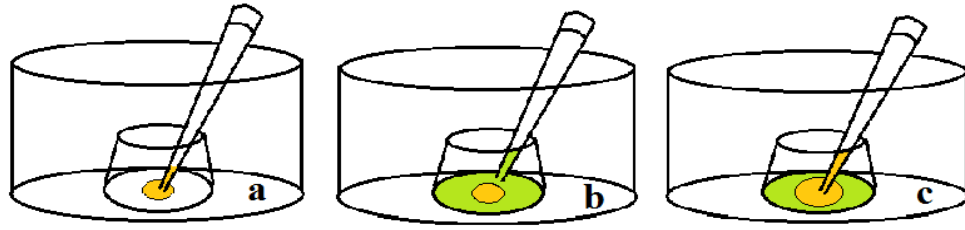
Çözdürme medyumları çalışmadan 1 gün önce hazırlanarak buzdolabında dinlendirildi ve çalışma günü buzdolabından çıkartılıp 38.5°C'ye gelene kadar (yaklaşık 45 dk) 38.5°C ısıda olan etüv içerisinde bekletildi.

OPS grubunda, OPS çözdürme solüsyonu 1 (OÇS 1) ve OPS çözdürme solüsyonu 2 (OÇS 2) olmak üzere 2 farklı medyum kullanıldı. OÇS 1 (Ek 7) olarak %20 CS ve 0.25 M süktroz içeren TCM199 medyumunu kullanıldı. OÇS 2 (Ek 8) olarak %20 CS ve 0.15 M süktroz içeren TCM199 medyumunu kullanıldı.

SSV grubunda, SSV çözdürme solüsyonu 1 (SÇS 1) ve SSV çözdürme solüsyonu 2 (SÇS 2) olmak üzere 2 farklı medyum kullanıldı. SÇS 1 (Ek 9) olarak %20 CS ve 0.3 M trehaloz içeren TCM199 medyumunu kullanıldı. SÇS 2 (Ek 10) olarak %20 CS içeren TCM199 medyumunu kullanıldı.

### - Maturasyon Medyumu

Maturasyon medyumuna eklenecek olan Na-piruvat stok solüsyonu hazırlandıktan sonra 0.20 µm'lik enjektör filtresinden (Sartorius Minisart, Lot no: 16534) geçirilerek steril 15 ml'lik konik uçlu tüp içine aktarıldı. Na-piruvat stok solüsyonu 1 ay boyunca +4°C'de muhafaza edildi. Maturasyon medyumunu ve maturasyon petripleri çalışmadan 1 gün önce hazırlanarak %5 CO<sub>2</sub>'li atmosferik ortamda, maksimum nemde, 38.5°C ısıda olan karbondioksitli etüvde (HERA cell 150, heraeus) içine ekilibre edildi. Maturasyon petrisi olarak ortası kuyucuklu petripler (Costar, USA) kullanıldı. Maturasyon petrisinin ortasındaki kuyucuğa 30 µl'lik maturasyon medyumundan damla oluşturuldu ve damlanın üzeri mineral yağ (Sigma M8410) ile kaplandı. Daha sonra oluşturulan damlayı büyötmek için 70 µl'lik maturasyon medyumunu, 30 µl'lik damla içine eklendi (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7.** Maturasyon damlası oluşturma. Maturasyon medyumundan 30 µl'lik damla oluşturma (a), 30 µl'lik oluşturulan damlanın mineral yağ ile kaplanması (b), mineral yağ il kaplanan 30 µl'lik damlanın içine 70 µl'lik maturasyon medyumunun eklenmesi (c).

Maturasyon medyumunu (Ek 11) olarak %10 FCS, 5 µg/ml LH, 0.5 µg/ml FSH, 27.5 µg/ml Na-piruvat ve antibiyotik (100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 0.25 µg/ml amfoterisin-B) içeren TCM199 medyumunu kullanıldı.

### 3.3.2. Oositlerin Vitrifikasyonu

Li ve ark. (2002) tarafından tarif edilen OPS ve SSV yöntemlerinin vitrifikasyonu kısmen modifiye edilerek yapıldı.

### -OPS (Open Pulled Straw= Açık Uçlu Modifiye Payet)

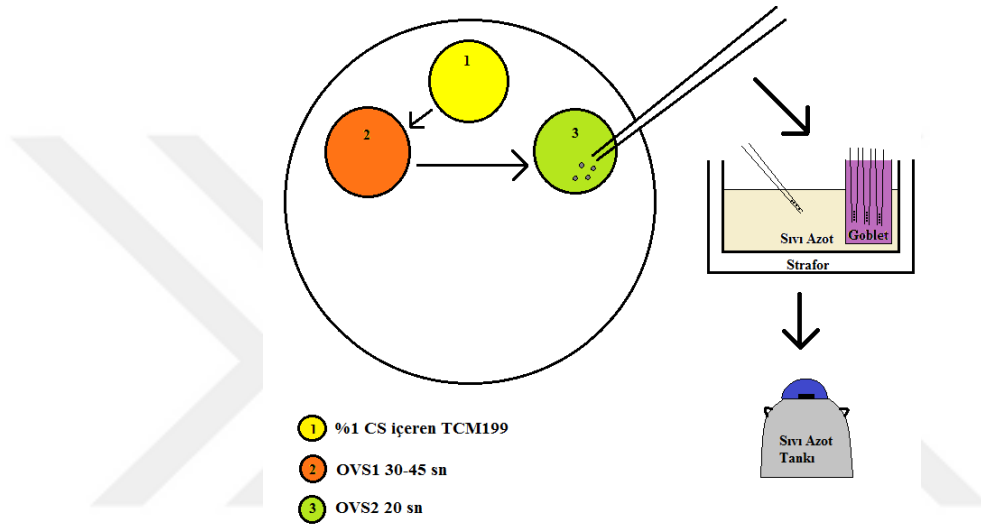
OPS vitrifikasyon işlemine başlamadan önce vitrifikasyon işlemi için ön hazırlık yapıldı. Strafor köpük kutu içerisine 3-4 lt sıvı azot dolduruldu. Sıvı azotun kaynaması kesildiğinde, sıvı azot ve strafor köpük kutunun sıcaklığı aynı derecededir. Strafor köpük kutu, kapağı ile kapatıldı ve vitrifikasyon işlemi için hazır hale getirildi. OPS payetlerini taşıyacak olan gobletlerin üzerine tarih yazıldı. Manipülasyon medyumunu, OVS 1 ve OVS 2 vitrifikasyon solüsyon damlacıkları, 90 mm'lik petri kabı içinde oluşturuldu. Birinci damla 200 µl'lik manipülasyon medyumundan (%1 CS içeren TCM199), ikinci damla 200 µl'lik OVS 1 solüsyonundan ve üçüncü damla 300 µl'lik OVS 2 solüsyonundan oluşturuldu. Vitrifikasyon işlemi için ön hazırlık bittiğinde dondurulacak olan oositler manipülasyon medyumuna içine alındı.



**Şekil 3.8.** İnsülin enjektörü yardımıyla OPS payetine oositlerin çekilmesi.

OPS yöntemi vitrifikasyon işleminde manipülasyon medyumunda bulunan oositler, OVS 1 solüsyonuna aktarıldı. Oositler, OVS 1 solüsyonunda pastör pipeti (Isolab 108.03.001, 150 mm cam pipetler) yardımı ile karıştırıldı. OVS 1 solüsyonunda 30-45 sn bekletildikten sonra oositler, OVS 2 solüsyonuna aktarıldı. Oositler, OVS 2 solüsyonunda karıştırıldıktan sonra 5-10 µl' lik hacimlerde olacak şekilde insülin enjektörü yardımıyla OPS payetine çekildi (Şekil 3.8). OPS payeti, sıvı azot yüzeyine 45 derecelik eğim ile hızlıca sıvı azot havuzuna daldırıldı. Oositlerin OVS 2 solüsyonuna aktarılmasından OPS payetine yüklenip sıvı azot içerisine daldırılmasına kadar geçen süre 20 sn idi. Oositlerin damlalara aktarılmasında modifiye edilmiş pastör pipetleri kullanıldı. Modifiye pastör pipeti,

pastör pipetinin uç kısmının biraz yukarisından ısıtıldı ve ısınan camın çekilerek uzatılması ile elde edildi. Sıvı azot içerisindeki vitrifiye edilen OPS payetleri, önceden soğutulmuş olan küçük goblet içerisinde yerleştirildi. Dondurulan OPS payetlerinin sıvı azot tankına yerleştirilmesinde kullanılan küçük gobletin üzerindeki tarih, küçük gobletin yerleştirildiği kalisterin numarası ve dondurulan oosit sayısı gibi bilgiler laboratuvar kayıt formuna not edildi. OPS vitrifikasyon yönteminin şematize hali şekil 3.9.'da gösterildi.



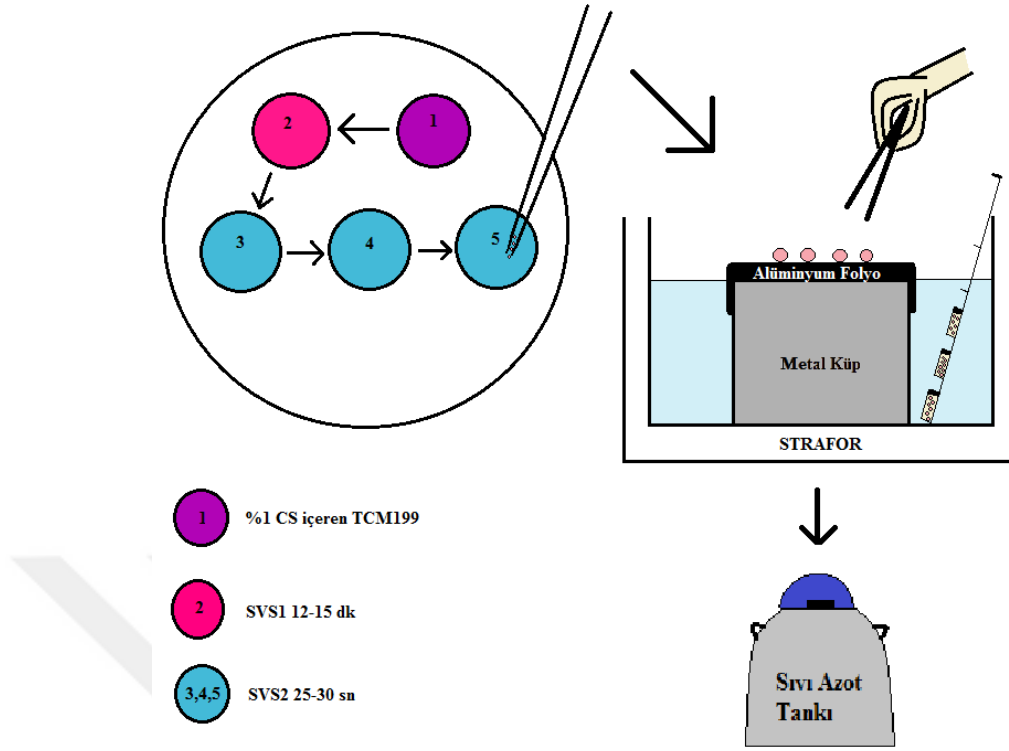
Şekil 3.9. OPS vitrifikasyon yönteminin şematifi.

### -SSV (Solid Surface Vitrification= Katı Yüzey Vitrifikasyonu)

SSV vitrifikasyon işlemine başlamadan önce vitrifikasyon işlemi için ön hazırlık yapıldı. Metal küpün üst yüzeyi alüminyum folyo ile kaplanarak strafor köpük kutunun ortasına yerleştirildi. Strafor köpük kutu içerisinde metal küpün üst hizasını geçmeyecek şekilde sıvı azot dolduruldu. Sıvı azotun kaynaması kesildiğinde sıvı azotun, metal küpün ve strafor köpük kutunun sıcaklığı aynı derecededir. Strafor köpük kutu, kapağı ile kapatıldı ve vitrifikasyon işlemi için hazır hale getirildi. SSV damlacıklarını taşıyacak olan kriyotüp üzerine tarih yazıldı. Kriyotüpleri taşımaya yarayan *cryostore cane*'lerin üzerine numara yazıldı. Manipülasyon medyumunu, SVS 1 ve SVS 2 vitrifikasyon solüsyonların damlacıkları, 90 mm'lik petri kabı içinde oluşturuldu. Birinci damla 200 µl'lik manipülasyon

medyumundan (%1 CS içeren TCM199), ikinci damla 200 µl'lik SVS 1 solüsyonundan ve üçüncü, dördüncü ve beşinci damlalar 200 µl'lik SVS 2 solüsyonundan oluşturuldu. Vitrifikasyon işlemi için ön hazırlık bittiğinde dondurulacak olan oositler, manipülasyon medyumuna içine alındı.

SSV yöntemi vitrifikasyon işleminde manipülasyon medyumunda bulunan oositler, SVS 1 solüsyonuna aktarıldı. Oositler, SVS 1 solüsyonunda pastör pipeti yardımı ile karıştırıldı. SVS 1 solüsyonunda 12-15 dk bekletilen oositler, toplamda 25-30 sn süre olacak şekilde SVS 2 solüsyonundan oluşan üçüncü, dördüncü ve beşinci damlalara aktarıldı. Oositler, SVS 2 solüsyonundan oluşan her damlada karıştırıldı. Oositler son olarak, modifiye pastör pipeti ile 10-15 µl' lik hacimlerde pipetleterek sıvı azot içerisinde yer alan soğutulmuş metal küp üzerine damlatıldı. Oositlerin SVS 2 solüsyonuna aktarılmasından metal küp üzerine damlatılmasına kadar geçen süre 25-30 sn idi. SSV damlacıkları, ucu soğutulan pens yardımıyla önceden *cryostore cane* üzerine yerleştirilerek soğutulmuş olan kriyotüpün içerisine konuldu. Sıvı azot tankındaki kalister sıvı azot tankının ağız kısmına getirildi ve soğutulmuş pens ile tutulan *cryostore cane*, bu kalister içindeki büyük goblet içine hızlıca yerleştirildi. Kalister sıvı azot tankındaki yerine tekrardan yerleştirildi. Dondurulan SSV damlacıklarınının sıvı azot tankına yerleştirilmesinde kullanılan kriyotüpün üzerindeki tarih, kriyotüpün yerleştirildiği *cryostore cane*'nin numarası, *cryostore cane*'nin yerleştirildiği kalister numarası ve dondurulan oosit sayısı gibi bilgiler laboratuvar kayıt formuna not edildi. SSV vitrifikasyon yönteminin şematize hali şekil 3.10'da gösterildi.



Şekil 3.10. SSV vitrifikasyon yönteminin şematığı.

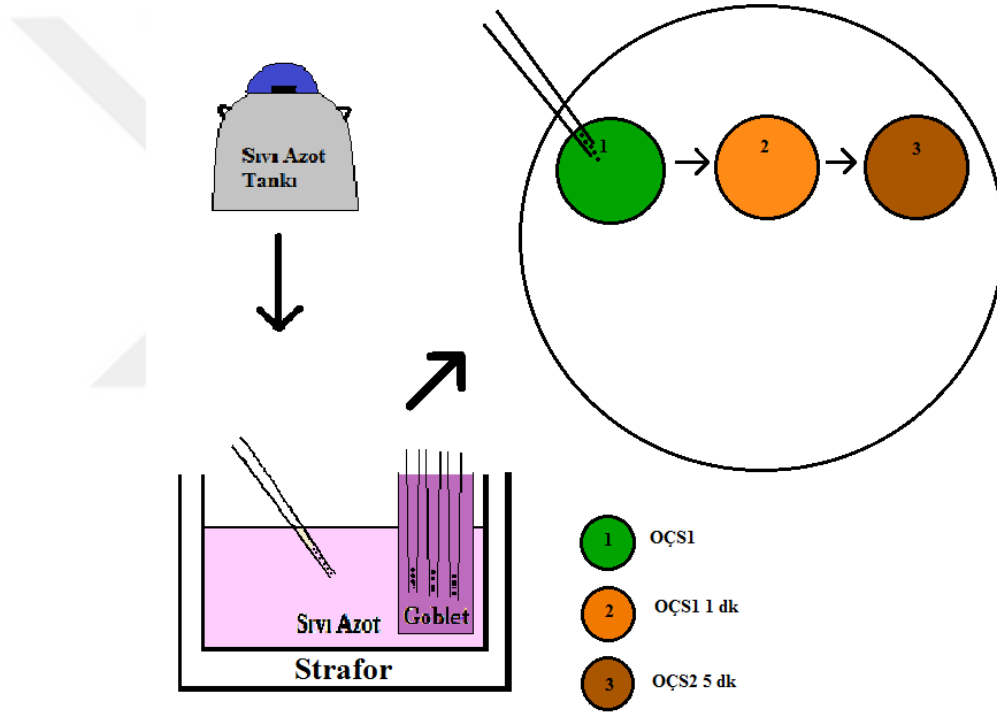
### 3.3.3. Oositlerin Çözdürülmesi

Li ve ark. (2002) tarafından tarif edilen OPS ve SSV yöntemlerinin çözdürülmesi kısmen modifiye edilerek yapıldı.

#### -OPS (Open Pulled Straw= Açık Uçlu Modifiye Payet)

OPS ile dondurulan oositlerin çözdürme işlemine başlamadan önce çözdürme işlemi için ön hazırlık yapıldı. Strafor köpük kutu içerisine 3-4 lt sıvı azot dolduruldu. Strafor köpük kutu, kapağı ile kapatıldı ve çözdürme işlemi için hazır hale getirildi. Etüv içerisinde 38.5°C sıcaklığına getirilen OÇS 1 ve OÇS 2 çözdürme solüsyonlarından 90 mm'lik petri kabı içinde damlacıklar oluşturuldu. Birinci ve ikinci damla 200 µl'lik OÇS 1 solüsyonundan ve üçüncü damla 200 µl'lik OÇS 2 solüsyonundan oluşturuldu. Çözdürme işlemi için ön hazırlık bittiğinde çözdürülecek olan OPS payetlerini taşıyan küçük goblet, sıvı azot tankından çıkarılıp hızlı bir şekilde sıvı azot dolu olan straför köpük kutu içerisine alındı.

OPS payetlerinin sıvı azottan çıkarılıp OÇS 1 damlasına aktarılan kadar payetin havada geçirdiği süre yaklaşık 5 sn kadardı. OPS yöntemi ile çözündürme işleminde OPS payetinin ucunda bulunan oositler, insülin enjektörü yardımıyla birinci damladaki OÇS 1 solüsyonuna aktarılarak karıştırıldı. Çözülen oositler hemen ikinci damladaki OÇS 1 solüsyonu içine alınıp karıştırılarak 1 dk bekletildi. Daha sonra oositler OÇS 2 solüsyonuna aktarılıp karıştırılarak 5 dk bekletildi. Çözürülen oositler, manipülasyon medyum damlasına aktarılarak tüm oositler çözündürülünceye kadar (yaklaşık 30 dk) etüvde bekletildi. OPS çözündürme yönteminin şematize hali şekil 3.11’de gösterildi.



Şekil 3.11. OPS vitrifikasyon yönteminde çözündürme şematifi.

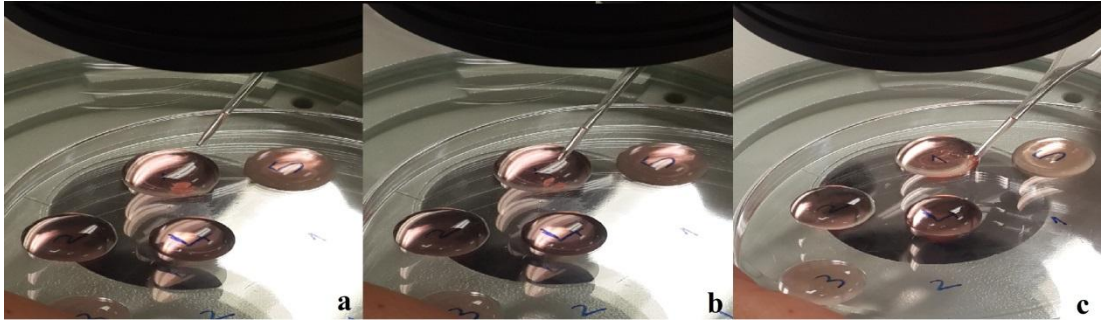
#### -SSV (Solid Surface Vitrification= Katı Yüzey Vitrifikasyonu)

SSV çözündürme işlemine başlamadan önce çözündürme işlemi için ön hazırlık yapıldı. Metal küpün üst yüzeyi alüminyum folyo ile kaplanarak, strafor köpük kutunun ortasına yerleştirildi. Strafor köpük kutu içerisine, metal küpün üst hizasını geçmeyecek şekilde sıvı azot dolduruldu. Strafor köpük kutu, kapağı ile kapatıldı ve çözündürme işlemi için hazır hale getirildi. Etüv içerisinde 38.5°C sıcaklığın getirilen

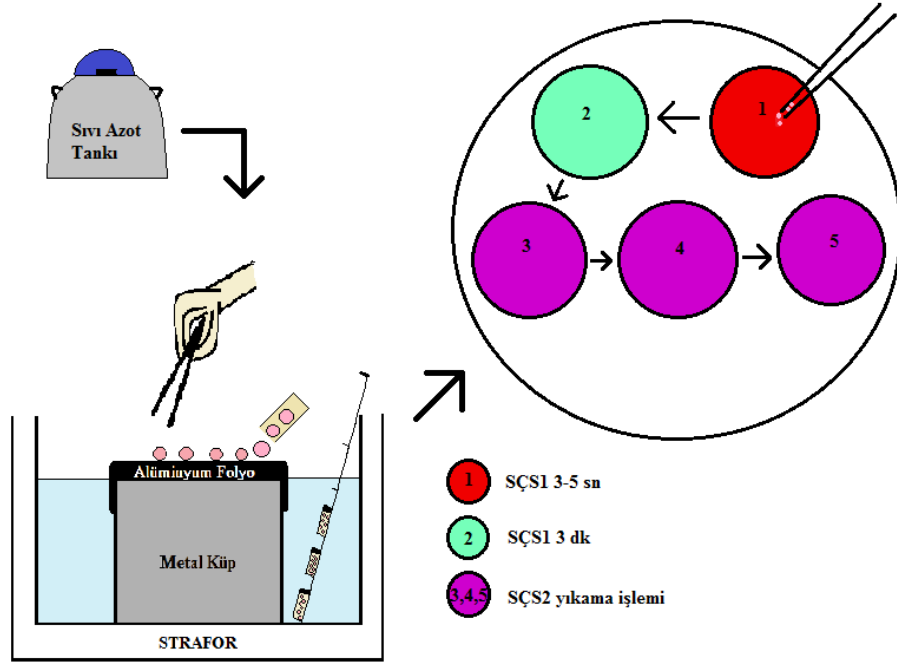


SÇS 1 ve SÇS 2 çözdürme solüsyonların damlacıkları, 90 mm'lik petri kabı içinde oluşturuldu. Birinci ve ikinci damla 200 µl'lik SÇS 1 solüsyonundan ve üçüncü, dördüncü, beşinci damlalar 200 µl'lik SÇS 2 solüsyonundan oluşturuldu. Çözdürme işlemi için ön hazırlık bittiğinde çözdürülecek olan SSV damlalarını taşıyan kriyotüp, sıvı azot tankından çıkarılıp hızlı bir şekilde sıvı azot dolu olan strafor köpük kutu içerisine alındı.

SSV yöntemi ile çözdürme işleminde SSV damlalarını taşıyan kriyotüpün kapağı açılarak kriyotüpün içindeki damlalar, alüminyum folyo ile kaplanan metal küp üzerine aktarıldı. SSV damlacıklarının metal küp üzerinden alınıp SÇS 1 damlasına aktarılana kadar damlacığın havada geçirdiği süre yaklaşık 5 sn kadardı. Oositleri içeren SSV damları, soğutulmuş pens ile tutulup birinci damladaki SÇS 1 solüsyonuna aktararak karıştırıldı (Şekil 3.12). Çözülen oositler hemen ikinci damladaki SÇS 1 solüsyonu içine alınıp karıştırılarak 3 dk bekletildi. Daha sonra oositler, sırasıyla üçüncü, dördüncü ve beşinci damlalardaki SÇS 2 solüsyonlarında karıştırılarak yıkama işlemi yapıldı. Çözdürülen oositler, manipülasyon medyum damlasına aktararak tüm oositler çözdürülünceye kadar (yaklaşık 30 dk) etüvde bekletildi. SSV çözdürme yönteminin şematize hali şekil 3.13'de gösterildi.



**Şekil 3.12.** SÇS 1 damlasına aktarılmış SSV damlacığı (a), SÇS 1 damlasında karıştırılarak çözünen SSV damlacığı (b) ve SÇS 1 damlasında çözünen oositlerin modifiye pastör pipetiyle alınması (c).



Şekil 3.13. SSV yönteminin çözürme şematığı.

### 3.3.4. İn Vitro Maturasyon

Ortası kuyucuklu petri kabının kuyucuk kısmına 100 µl'lik maturasyon medyum damlası hazırlandı ve üzeri mineral yağ ile kaplanarak çalışmadan 1 gün önce CO<sub>2</sub>'li etüvde ekilibrasyona bırakıldı. Çalışmaya başlamadan hemen önce kuyucuklu petrinin dış alanında maturasyon medyumundan toplamda 7 damla (her biri 100 µl) olacak şekilde damlacıklar hazırlandı. Karşılıklı duran 3 adet maturasyon damlasında 9-12 adet oosit 3 kez yıkandı (Şekil 3.14. a). Yıkanan tüm oositler, tek bir maturasyon damlasının içinde toplandı. Toplanan oositler (yaklaşık 18-23 adet oosit) modifiye pastör pipeti yardımı ile önceden hazırlanmış olan kuyucuk içindeki 100 µl'lik maturasyon medyum damlası içine yüklendi (Şekil 3.14. b). İn vitro maturasyon işlemi, oositlerin %5 CO<sub>2</sub>'li atmosferik ortamda, maksimum nemde, 38.5°C ısıda olan karbondioksitli etüv içinde, mineral yağ ile kaplanmış maturasyon medyumunda 22 – 24 saat boyunca inkübe edilmesiyle yapıldı.



**Şekil 3.14.** Oositlerin maturasyon medyumunda yıkanması (a) ve yıkanan oositlerin IVM damlasına aktarılması (b).

### 3.3.5. Maturasyon Kriterlerinin Değerlendirilmesi

Maturasyon değerlendirilmesinde oositlerde kumulus ekspansiyonunun ve perivitellin boşlukta polar body'nin görülmesi olmak üzere 2 maturasyon kriteri dikkate alınmıştır.

#### - Kumulus Ekspansiyonunun Değerlendirilmesi

Çalışmada kumulus ekspansiyonu değerlendirilmesi Kobayashi ve ark.'nın (1994) bildirdiği gibi 0 derece, 1 derece, 2 derece olmak üzere değerlendirilmiştir. İmmatür oositlere kıyasla morfolojik bir değişim görülmeyen oositler 0 derece, kumulus hücreleri genişlemiş olup hücreler arasındaki bağların göreceli olarak hala sıkı olan oositler 1 derece, kumulus hücreleri daha çok genişleyerek homojen şekilde yayılan oositler 2 derecede kumulus ekspansiyonu olarak kabul edildi.

#### -Polar Body'nin Belirlenmesi

Çalışmada IVM' e tabi tutulan oositler, 100 µl manipülasyon medyumunu (%1 CS içeren TCM199) eklenen gode içine alınmıştır. Gode içindeki oositler, 7-8 dk boyunca yüksek hızla vortekslenerek (Bio Vortex V1, BİOSAN) kumulus hücrelerinden soyuldu. Soyulan oositleri içeren manipülasyon medyumunu, pastör pipeti yardımıyla manipülasyon medyumunu içeren 90 mm'lik petri içine aktarıldı ve

oositler yıkanarak yeni manipülasyon medyumu içine aktarıldı. Oositlerin her biri pastör pipeti yardımıyla döndürülerek perivitellin boşluğunda polar body atan oositler pozitif (PB+), polar body atmayan oositler negatif (PB-) ve dejenere olan oositler olarak sınıflandırıldı. Oositler, morfolojik yönden incelenerek not edildi.

### **3.4. İstatistiksel Analiz**

Çalışmada elde edilen veriler Excell programında tablo haline getirildikten sonra Minitab ve SPSS18 programında Ki-kare tesri ile analiz edildi.



#### 4. BULGULAR

Çalışmada mezbahada kesilen 139 inekten 277 adet ovaryum sağlandı ve toplam 2346 folikül tespit edilerek 2128 folikül aspire edildi. Kaliteli oosit sayısı 827 (% 75.39), kalitesiz oosit sayısı 270 (% 24.61) olmak üzere toplam oosit sayısı 1097 idi. Ovaryum başına ortalama folikül sayısı 8.47 ve ortalama aspirasyon sayısı 7.68 olarak bulundu. Aspirasyon başarısı % 51.55 olarak belirlendi. Ovaryum başına elde edilen ortalama oosit sayısı 3.96 ve ortalama kaliteli oosit sayısı 2.99 idi. Çalışmada kullanılan inek, ovaryum, folikül ve folikül aspirasyon sayıları tablo 4.1.'de verildi. Çalışmada kullanılan toplam oosit, kaliteli, kalitesiz ve çalışmaya dahil edilen kaliteli oosit sayıları tablo 4.2.'de verildi.

**Tablo 4.1.** Çalışmada kullanılan inek, ovaryum, folikül ve folikül aspirasyon sayıları.

	İnek Sayısı	Ovaryum Sayısı	Folikül Sayısı	Folikül Aspirasyon Sayısı
Vitrifikasyon Grupları	69	137	1239	1076
Kontrol Grubu	70	140	1107	1052
Toplam	139	277	2346	2128

**Tablo 4.2.** Çalışmada kullanılan oosit sayıları.

	Toplam Oosit Sayısı	Kaliteli Oosit Sayısı	Kalitesiz Oosit Sayısı	Çalışmaya Dahil Edilen Kaliteli Oosit Sayısı
Vitrifikasyon Grupları	535	419	116	300
Kontrol Grubu	562	408	154	150
Toplam	1097	827	270	450

#### **4.1. Vitrifikasyon ve Çözdürme Sonrası Elde Edilen Bulgular**

OPS vitrifikasyon solüsyonlarına (OVS 1 ve OVS 2) aktarılan oositlerde hızlı bir şekilde dehidrasyon gözlemlendi. SSV birinci adım vitrifikasyon solüsyonuna (SVS 1) aktarılan oositlerde çok yavaş bir şekilde dehidrasyon gözlenirken, SSV ikinci adım vitrifikasyon solüsyonuna (SVS 2) aktarılan oositlerde hızlı bir şekilde dehidrasyon gözlemlendi. Oositler, OVS 1 ve SVS 1 vitrifikasyon solüsyonlarında manipüle edilirken herhangi bir sorunla karşılaşmadı. OVS 2 ve SVS 2 vitrifikasyon solüsyonlarına aktarılan oositler, solüsyon yüzeyine çıktığı için solüsyonlar ile karıştırılmasında güçlükler yaşandı. Oositlerin vitrifikasyon solüsyonlarında kalma süresi çok önemli olduğundan dolayı her bir OPS payeti ve SSV damlası içine 2-4 oosit yüklenildi. SSV damlacıkları soğutulmuş pens yardımıyla kriyotüp içerisine konulurken metal soğutulmuş pensi tutan parmaklar soğuktan hasar gördü. SSV damlacığı metal küp üzerine damlatıldığında damlanın birkaç parçaya ayrıldığı ve metal küpün üzerinden sıvı azot içine düştüğü gözlemlendi. Bu durum vitrifikasyon işlemini zorlaştırdı. Çünkü çok küçük damlalar sıvı azot içerisinde gözden kaçarsa damlanın içindeki hücreler kaybedilebilir ve sıvı azot içerisindeki damlanın alınması, vitrifikasyon işlemini daha da zorlaştırdı.

Çözdürme işlemi için sıvı azottan çıkarılan OPS payetlerinin ve SSV damlacıklarının cam halini korudukları görüldü. Çözdürme solüsyonuna aktarılan SSV damlacıklarında ve OPS payetlerinde bulutlanma görünümü oluşmadığı ve cam halinde kaldıkları belirlendi. OPS payetinden ve SSV damlasından alınan dehidre oositler, çözdürme solüsyonlarında yavaş bir şekilde normal görünümlerine döndüler.

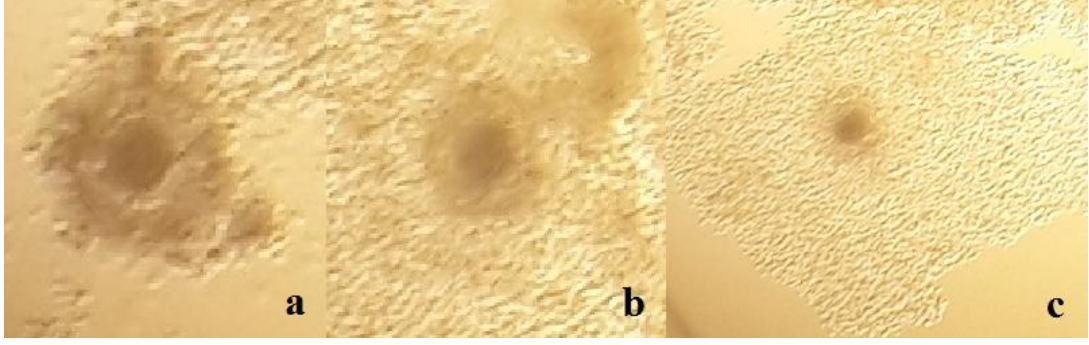
#### **4.2. Maturasyon Sonrası Elde Edilen Bulgular**

Maturasyon sonrasında oositler, stereomikroskop altında ilk olarak kumulus ekspansiyonları bakımından incelendi. OPS grubunda (n= 146) 118 (%80.82) oosit 2 derecede, 22 (%15.07) oosit 1 derecede ve 6 (%4.11) oosit ise 0 derecede kumulus ekspansiyonu gösterdi. SSV grubunda (n= 144) 113 (%78.47) oosit 2 derecede, 20 (%13.89) oosit 1 derecede ve 11 (%7.64) oosit ise 0 derecede kumulus ekspansiyonu

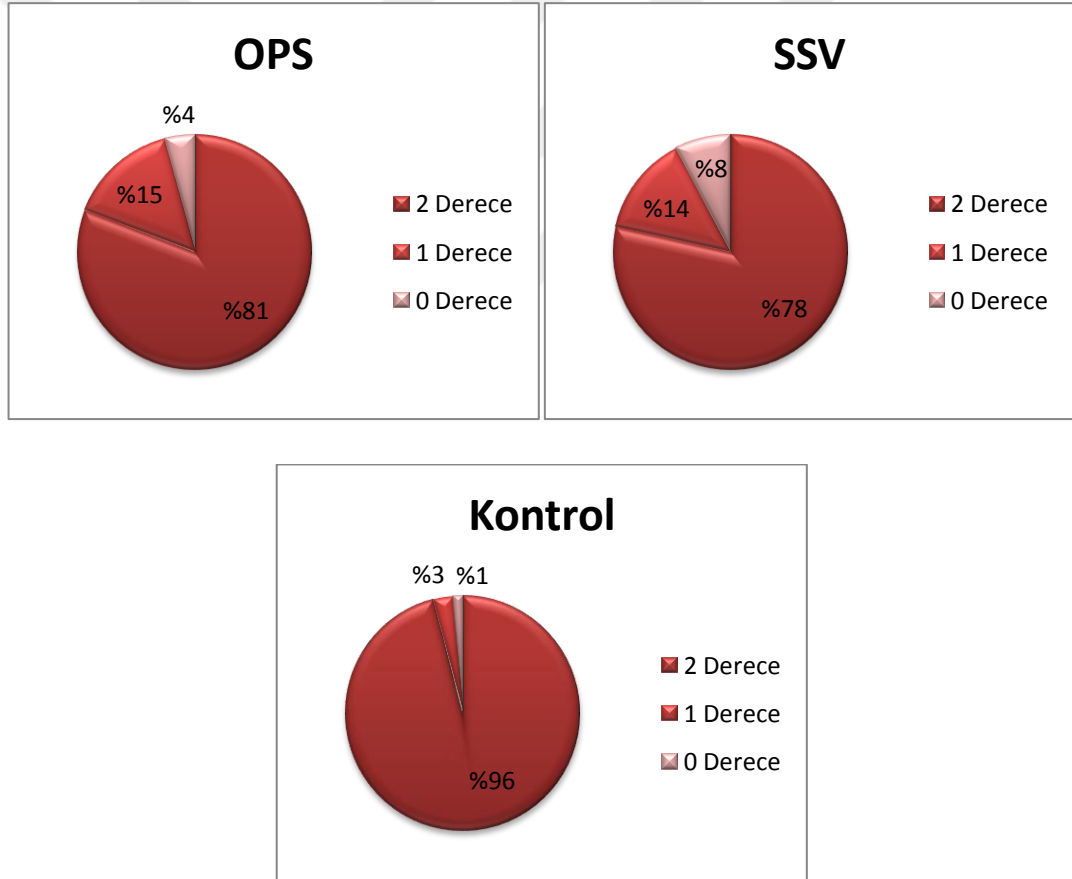
gösterdi. Kontrol grubunda (n= 150) 144 (%96.00) oosit 2 derecede, 4 (%2.67) oosit 1 derecede ve 2 (%1.33) oosit ise 0 derecede kumulus ekspansiyonu gösterdi. Yapılan istatistiki değerlendirmede OPS ve SSV grupları arasında önemli derecede bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). OPS ve SSV grupları, kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulundu ( $p<0.001$ ). Kumulus ekspansiyonunun derecelerini gösteren oositler, şekil 4.1’de ve gruplardaki kumulus ekspansiyonu dağılımları ise tablo 4.3 ve şekil 4.2’ de yer almaktadır.

**Tablo 4.3.** Maturasyon sonrası gruplardaki kumulus ekspansiyon bulguları. Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli derecede farklıdır ( $p<0.001$ ).

Gruplar	Kumulus Ekspansiyon Değerlendirilmesi			Kumulusların soyulmasında oluşan kayıplar (%)
	2 Derece (%)	1 Derece (%)	0 Derece (%)	
OPS (n=146)	118 (80.82) a	22 (15.07)	6 (4.11)	8 (5.48)
SSV (n=144)	113 (78.47) a	20 (13.89)	11 (7.64)	10 (6.94)
Kontrol (n=150)	144 (96.00) b	4 (2.67)	2 (1.33)	13 (8.67)



**Şekil 4.1.** Üç farklı derecedeki kumulus ekspansiyonunun değerlendirilmesi. (a) 0 derece: İmmatür oositlere kıyasla morfolojik bir değişim gözlenmedi, (b) 1 derece: Kumulus hücreleri genişledi, fakat hücreler arasındaki bağ hala göreceli olarak sıkıydı, (c) 2 derece: Kumulus hücreleri daha çok genişleyerek homojen şekilde yayıldı.

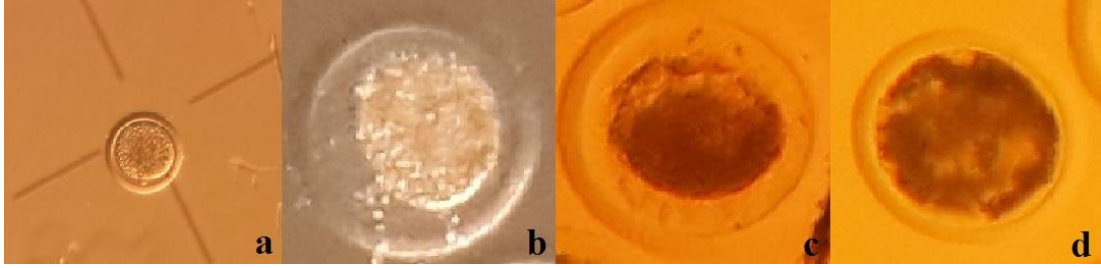


**Şekil 4.2.** Gruplardaki kumulus ekspansiyonu dağılım grafiği.

Maturasyon sonrasında kumulus hücreleri soyulan oositler, steromikroskop altında polar body varlığı ve oositin morfolojik durumu (Şekil 4.3.) incelendi. Tamamen kumulus hücreleri soyulan oositler modifiye pastör pipeti yardımıyla



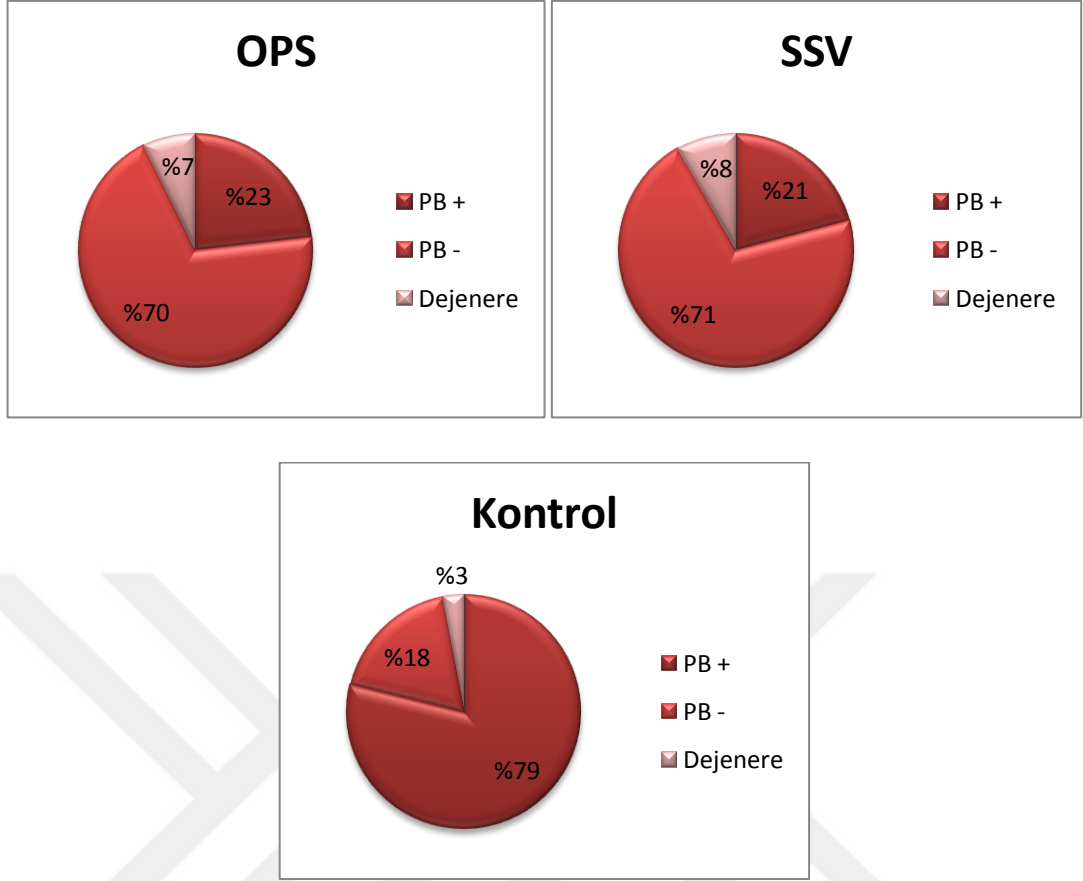
döndürülerek polar body varlığı incelendi. SSV ve OPS grubunda zona pellusida kırılması saptanmadı.



**Şekil 4.3.** Perivitellin boşluğu normal şekilde oluşmuş ve bu boşluğa polar body atan matür oosit (a), perivitellin boşluğu çok genişlemiş oosit (b), ooplazması elips şeklinde olan oosit (c), heterojen ooplazma görünümlü oosit (d).

**Tablo 4.4.** Maturasyon sonrası gruplardaki polar body bulguları. Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli derecede farklıdır ( $p<0.001$ ).

Gruplar	Polar Body Atan Oosit Sayısı (%)	Polar Body Atmayan Oosit Sayısı (%)	Dejenere Oosit Sayısı (%)
OPS (n=138)	32 (23.19) a	96 (69.56) a	10 (7.25) a
SSV (n=134)	28 (20.90) a	95 (70.90) a	11 (8.20) a
Kontrol (n=137)	108 (78.83) b	25 (18.25) b	4 (2.92) a



**Şekil 4.4.** Gruplardaki polar body ve dejenerasyon oranlarının grafiği.

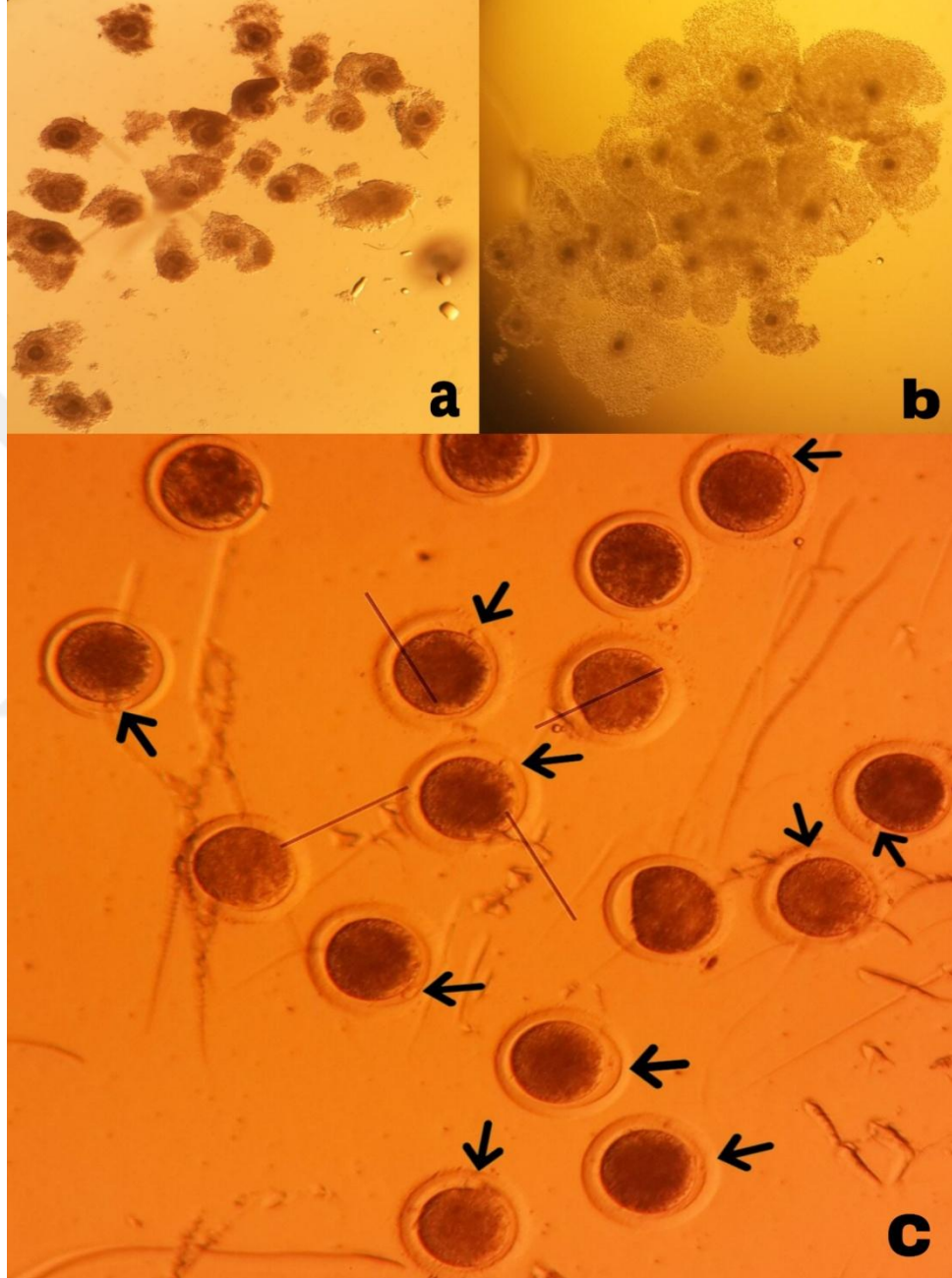
İncelenme sonrasında OPS grubunda (n= 138) 32 (% 23.19) adet oositin polar body attığı, 96 (% 69.56) adet oositin polar body atmadığı ve 10 (% 7.25) adet oositin dejenere olduğu belirlendi.

SSV grubunda (n= 134) 28 (%20.90) adet oositin polar body attığı, 95 (% 70.90) adet oositin polar body atmadığı ve 11 (% 8.20) adet oositin dejenere olduğu belirlendi.

Kontrol grubunda (n= 137) 108 (%78.83) adet oositin polar body attığı, 25 (% 18.25) adet oositin polar body atmadığı ve 4 (% 2.92) adet oositin dejenere olduğu belirlendi.

Yapılan istatistiki değerlendirmede OPS ve SSV grupları arasında önemli derecede bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). OPS ve SSV grupları, kontrol grubuna kıyasla önemli derecede düşük bulundu ( $p<0.001$ ). Gruplardaki polar body ve dejenerasyon

oranları dağılımları tablo 4.4 ve şekil 4.4’ de yer almaktadır. Maturasyon öncesi immatür oositlerin, maturasyon sonrası kumulusları ekspansiyon olan ve polar body atan oositlerin görünümü şekil 4.5’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** Maturasyon öncesi immatür oositlerin görünümü (a), maturasyon sonrası kumulus ekspansiyon görünümü (b), kumulus hücreleri soyulan ve perivitellin boşluğa polar body atan oositlerin görünümü (c).

## 5.TARTIŞMA

Yavaş dondurma yöntemiyle dondurulan oositlerdeki başarı oranı, embriyolardaki başarı oranı kadar yüksek bulunmaması nedeniyle araştırmacıların vitrifikasyon yöntemine olan ilgisi artmıştır. Fakat immatür ve matür oositlerin kriyobiyolojik özellikleri nedeniyle vitrifikasyon yönteminde de sorunlarla karşılaşmıştır. Bu sorunlardan en önemlisi, matür oositlerde kromozomların üzerine dizilen iğ ipliklerinde hasar meydana gelmesidir. Kromozomların daha kromatin halinde ve germinal vezikül içerisinde olan oositlerin dondurulması, bu hasarın önüne geçmek için bir seçenek oluşturmaktadır (Kuleshova ve Lopata, 2002).

Aspirasyon yönteminde 18 G'lik iğnelerin kullanılması, oositlerin toplanma esnasında kumulus hücrelerinin zarar görmemesi için önerilmektedir (Bols ve ark., 1996). Duran (2000), aspirasyon yönteminde aspire edilen foliküllerin % 30-60'ından oosit toplanabileceğini ifade etmektedir. Ün ve Küplülü (2005), sığırlarda 2-7 mm'lik folikülleri aspire ederek % 93.3'lük aspirasyon başarısına ulaşmışlardır. Araştırmacılar ovaryum başına düşen ortalama folikül sayısını 5.11 ve ovaryum başına elde edilen ortalama oosit sayısını ise 4.7 olarak bulmuşlardır. Çetin (2004), aspirasyon yöntemiyle % 30.72 oosit aspirasyon başarısına ulaşmıştır. Araştırmacı ovaryum başına ortalama elde edilen aspirasyon sayısını 11.29, ovaryum başına elde edilen oosit sayısını 3.47 ve ovaryum başına elde edilen ortalama kaliteli oosit sayısını 2.41 olarak bulmuştur. Çalışmamızda aspirasyon başarısı % 51.55, ovaryum başına düşen ortalama folikül sayısı 8.47, ovaryum başına elde edilen ortalama aspirasyon sayısı 7.68, ovaryum başına elde edilen ortalama oosit sayısı 3.96 ve ovaryum başına elde edilen ortalama kaliteli oosit sayısı 2.99 olarak belirlendi. Bu çalışmada foliküllerin % 51.55'inden oosit elde edilerek Duran'a (2000) benzer, Çetin'in (2004) bildirdiğine göre nispeten yüksek oran, Ün ve Küplülü'nün (2005) bildirdiğine göre ise nispeten düşük oran bulunmuştur. Çalışmalardaki bu oran farkları, mevsim, beslenme gibi birçok faktörlere bağlı olan ovaryumlardaki folikül popülasyonu farklılıklarından ve kişisel el manipülasyonundaki değişkenlikten dolayı olduğu düşünülmektedir.

Wu ve ark. (2017b) 6 oositi, Yu ve ark. (2016) 3-5 oositi, Chen ve ark. (2014) 5-7 oositi, Hyttel ve ark. (2000) 2-4 oositi OPS payeti içerisinde vitrifiye etmişlerdir. Sripunya ve ark. (2014) 5 oositi, Liang ve ark. (2012) 20-30 oositi SSV damlası içerisinde vitrifiye etmişlerdir. Çalışmamızda ise 2-4 adet oosit hem OPS payetinin içerisinde hem de SSV damlasının içerisinde vitrifiye edildi. Böylece oositler rahatlıkla vitrifikasyon solüsyonunda karıştırıldı ve oositlerin vitrifikasyon solüsyonunda kalma süresi aşılmadan OPS payetine yüklenerek sıvı azot içerisine daldırıldı veya SSV damlacığı oluşturularak metal küp üzerine damlatıldı. Oositlerin çok kısa süre (20-30 sn) içerisinde, vitrifikasyon solüsyonuyla yeterince karıştırılmaları ve vitrifikasyon solüsyonuna maruz kalma süresinin aşılmaması için az sayıda oositin kullanılması, vitrifikasyon için avantaj oluşturabileceği düşünülmektedir. Aksi halde OPS vitrifikasyonunda daha fazla oositin (> 7 adet oosit) dondurulması, kısa süre içerisinde oositlerin vitrifikasyon solüsyonuyla karıştırılması ve oositlerin OPS payetine çekilmesi işlemlerini güçleştireceğinden dolayı oositlerde toksik hasarların oluşabileceği düşünülmektedir. Aynı nedenlerden dolayı SSV vitrifikasyonunda da az sayıda oosit (< 7 adet oosit) kullanılması, vitrifikasyon için avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Mitokondrinin birincil işlevi, motilite, hücre sel homeostazın korunması ve hücre sağ kalımının düzenlenmesi gibi normal fizyolojik fonksiyonlar için gerekli olan ATP'yi oluşturmaktır (Fu ve ark., 2009). Vitrifikasyon sonrasında hasar gören mitokondri, yağ asidi metabolizmasını ve ATP üretim yeteneğini azaltır, böylece oositlerde lipid damlacıklarının birikmesine yol açar. Oositlerin yüksek kriyoprotektan konsantrasyonlarına maruz kalması, kortikal granüllerin erken salınımını tetikleyerek vitrifikasyon sonrasında oosit canlılığını düşürdüğü ve zona pellusidanın sertleşmesine neden olduğu bildirilmiştir (Diez ve ark., 2005; Carroll ve ark., 1990; Hurtt ve ark., 2000). Çalışmamızda kortikal granül dağılımı incelenmesi ve IVF yapılmadı. Bununla birlikte araştırmacıların yaptığı çalışmanın sonuçlarına paralel olarak, yüksek kriyoprotektana maruz kalan OPS ve SSV grubundaki oositlerin maturasyon bulgularına dayanarak kontrol grubundaki oositlere göre canlılık oranları düşük bulundu.

Vitrifikasyon sonrasında oosit kalitesini etkileyebilecek bir faktör, kriyoprezervasyon öncesinde oosit etrafındaki kumulus hücrelerinin varlığı veya yokluğudur (Mahmoud ve El-Sokary, 2013). Germinal vezikül evresindeki oositlerin donma kabiliyetinin düşük olduğu ve preovulatar oositlerin kriyoprezerve edilmesi için çok az girişimde bulunduğu bildirilmiştir (Miyake ve ark., 1993). Nandi ve ark. (1998), matür buffalo oositlerinin vitrifiye edilmeksizin fertilizasyon sırasında kumulus hücrelerinin eksikliğinden etkilenerek morula ve blastosist oranlarının daha düşük olduğunu gözlemlemiştir. Tharasanit ve ark. (2009), vitrifikasyon öncesinde kumulus hücrelerinin soyulmasının, hem immatür hem de matür vitrifiye edilen at oositlerinde, oosit morfolojisi üzerinde zararlı bir etkiye sahip olduğunu gözlemlemiştir. Vitrifikasyon öncesinde at oositlerinden kumulusların soyulmasının, mayotik yeteneğin, M II iğ ve kromatin kalitesinin düşmesine neden olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte Zhang ve ark. (2009), kumulus hücreleri olan veya olmayan vitrifiye matür koyun oositlerinin hayatta kalma oranlarında hiçbir fark olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmanın aksine, Bogliolo ve ark. (2007), kumulus hücreleri olmadan vitrifiye edilen immatür koyun oositlerinin kumulus hücreleri olanlara göre anlamlı derecede daha yüksek bir hayatta kalma ve mayotik maturasyon oranı gösterdiklerini ve iki grup arasında iğ ve kromatin organizasyonunda hiçbir farklılık olmadığını gözlemlemiştir. Zhou ve ark. (2010), GV aşamasındaki sığır oositlerini kumulus hücreleriyle vitrifiye ettiğinde, kısmen soyulan oositlere göre fertilizasyon sonrasında embriyo gelişimi daha yüksek olduğunu fakat M II aşamasındaki sığır oositlerinin vitrifikasyonunda kumulus hücrelerinin her hangi bir etkisinin olmadığını bildirmiştir. Kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması, MPF aktivitesini arttırarak metafaz aşamasına geçişini ve kortikal granüllerin dağılımını hızlandırdığı görülmüştür. Purohit ve ark. (2012), immatür ve matür keçi oositlerinin vitrifikasyonu üzerine kumulus hücrelerinin etkilerini incelemiştir. Vitrifiye edilen kumulus hücreli immatür keçi oositleri, soyulan immatür oositlerine göre maturasyon oranlarının yüksek ve fertilizasyon oranlarının benzer olduğu bildirilmiştir. Vitrifiye edilen matür oositlerinde ise fertilizasyon oranlarında önemli bir fark bulunmamıştır. Araştırmacılar, vitrifiye edilen immatür oositlerin matür oositlere göre fertilizasyon oranlarının önemli derece yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Im ve ark. (1997), dondurulup çözödürölen kumuluslu

immatür sığır oositlerinin, soyulan oositlere göre IVM sonrasında M II'e ulaşan oosit oranının önemli derece yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Miyake ve ark., (1993) vitrifiye edilen kumululu immatür fare oositlerinin, soyulan immatür oositlere göre daha yüksek canlılık oranına sahip olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, kumulüs hücrelerinin dondurma sırasında oosit içine giren kriyoprotektanı yavaşlattığını, fazla miktarda kriyoprotektanın girmesiyle oluşabilecek toksik hasarı önlediğini, kriyoprotektanın çıkarılması sırasında şişmeye bağlı olan ozmotik hasarı engellediğini ve bu yüzden vitrifiye edilecek oositin kumulüs hücreleri ile kaplı olması gerektiğini bildirmişlerdir. Park ve ark. (2001), matür fare oositlerinde, Dinnyes ve ark. (2000), matür sığır oositlerinde, kumulüs hücreleriyle birlikte vitrifiye edilmesinin daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Dhali ve ark. (2000), oositin çevresinde sıkı şekilde birbirlerine bağlı olan kumulüs hücrelerinin EG ve DMSO'nun yeterli miktarda oosit içine girmesine engel olabileceğini bildirmiştir. Çalışmamızda ise en az 3 kat kumulüs hücreleriyle çevrili olan oositler kullanıldı. Miyake ve ark.'nın (1993), bildirdiğine benzer şekilde, çözündürme sırasında oositler aşırı şekilde şişmeden normal görünümüne kavuştuğu gözlemlendi. Oositlerin sıkı bir kumulüs hücreleriyle kaplı olması ve oositlerin kısa sürelerde (OPS için 20 sn, SSV için 25-30 sn) kriyoprotektana maruz kalması, Dhali ve ark.'nın (2000) da bildirdiği gibi oosit içine yeterli kriyoprotektan girmesine engel olabileceği ve bundan dolayı hasarlar meydana gelebileceği düşünülmektedir.

Goud ve ark. (2000), PROH kullanarak yavaş dondurma yöntemiyle dondurulan insan oositlerinde kumulüs ekspansiyonunun oluştuğunu ve bu ekspansiyonun, dondurma ve çözündürme sırasında, oositin büzülmesine ve şişmesine bağlı olarak kumulüs hücreleri arasındaki bağların zarar görmesi nedeniyle oluşabileceğini bildirmiştir. Hurtt ve ark. (2000), EG ve OPS ile vitrifiye edilen at ve sığır oositlerinde çözündürme sonrası kumulüs hücrelerinin ekspansiyonunu ve bu ekspansiyonun kumulüs-oosit arasındaki *gap junction* gibi bağlantıların hasar görmesinden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar kriyoprotektana maruz kalan oositlerde, düzensiz kortikal granül dağılımının olduğunu da bildirmiştir. Çetin (2004), klasik payet ile sığır oositlerinin vitrifikasyonu sonrasında sadece DMSO grubunda kumulüs dağılımının meydana geldiğini, EG ve karma (EG+DMSO) grubunda ise kumulüs dağılımının meydana gelmediğini

gözlemlemiştir. Araştırmacı çözdürülen oositlerin IVM sonrası kumulus ekspansiyon oranlarının EG grubunda % 93.52 (130/139), DMSO grubunda % 78.62 (114/145), karma grubunda % 87.76 (165/188), kontrol (vitriyifiye edilmeyen) grubunda ise % 95.14 (98/103) olduğunu bildirmiştir. Kobayashi ve ark.'nın (1994), in vitro maturasyon çalışmasında LH + FSH grubunda % 99.2 (118/119) oranında kumulus ekspansiyonu gözlemlemiştir. Çalışmamızın IVM sonrası kontrol grubunda % 96 kumulus ekspansiyon oranıyla, Kobayashi ve ark.'nın (1994) IVM çalışmasının LH + FSH grubundaki ve Çetin'in (2004) kontrol grubundaki kumulus ekspansiyon oranına benzer bulunmuştur. Çalışmamızın IVM sonrası EG+DMSO kullanılan OPS grubunda % 80.82 kumulus ekspansiyon oranıyla, Çetin'in (2004) EG+DMSO grubuyla benzer ve EG kullanılarak SSV grubunda % 78.47 kumulus ekspansiyon oranıyla, Çetin'in (2004) EG grubundan düşük bulunmuştur. Çetin'in (2004) çalışmasından düşük olması, kumulus-oosit arası bağların hasar görmüş olabileceğini düşündürmüştür.

Mevcut çalışmalar zona kırığının esas olarak çözdürmeye bağlı olduğuna dair kanıt sağlamaktadır. Kriyomikroskopik çalışmalar, -110°C'nin altındaki sıcaklıklarda sıvı kanalların tamamen katılaşmasından ve çözdürme sırasındaki ani sıcaklık değişiminden dolayı termal olarak uyarılan mekanik bir stresin meydana geldiğini bildirmektedir. Çözdürme esnasında ortaya çıkan ani sıcaklık değişimi, sıvı kanallarında kırılmalara neden olmaktadır (Subramaniam ve ark., 1990). Subramaniam ve ark. (1990), çözdürme işleminde payetlerin direk su banyosunda çözdürülmeden önce havada bekletilmesinin bu durumu engellediğini bildirmektedirler. Çetin (2004), çözdürme işleminde payetleri 5 sn havada beklettiğinde EG grubunda 2 oositte, DMSO grubunda ise 3 oositte zona kırılmasına rastlarken, karma grubunda böyle bir duruma rastlamamıştır. Çalışmamızda SSV damlacıklarının ve OPS payetlerinin sıvı azottan çıkarılıp çözdürme solüsyonuna aktarılınca kadar havada geçen süre 5 sn idi. Her iki vitrifikasyon yönteminde çözdürülen oositlerde zona kırılmasının görülmemesi, Çetin (2004) ve Subramaniam ve ark.'nın (1990) bulgularını desteklemektedir. Bu yüzden OPS payetlerini ve SSV damlacıklarını çözdürmeden önce havada kısa süre geçirmesinin avantaj oluşturabileceği düşünülmektedir.



Sharma ve Purohit (2008), immatür buffalo oositlerini 4.5 M EG, 5.5 M EG, 4.5 M DMSO ve 5.5 M DMSO olmak üzere 4 farklı grupta 0.5 M sükröz ve DPBS' dan oluşan vitrifikasyon solüsyonu kullanarak OPS payetlerinde vitrifiye etmişlerdir. IVM sonrasında oositler orsein boyası ile boyanarak incelendiğinde 4.5 M EG grubunda % 29.41, 5.5 M EG grubunda % 39.13, 4.5 M DMSO grubunda % 25.55, 5.5 M DMSO grubunda % 36.04 ve kontrol grubunda ise % 63.36 oranında M II aşamasına gelmiş oosit elde edilmiştir. Hurtt ve ark. (2000), immatür sığır oositlerini 5 M EG, % 18 fikol, 0.5 M sükröz içeren vitrifikasyon solüsyonunu kullanarak OPS payetlerinde vitrifiye etmişlerdir. IVM sonrasında oositler aseto-orsein boyası ile boyanarak incelendiğinde OPS grubunda % 60 (18/30), kontrol grubunda ise % 77 (23/30) oranında M II aşamasına gelmiş oosit elde edilmiştir. Matsumoto ve ark. (2001), immatür sığır oositlerini % 40 EG, %18 fikol, 0.3 M sükröz içeren vitrifikasyon solüsyonunu kullanarak EM grid ve naylon mesh içinde vitrifiye etmişlerdir. IVM sonrasında oositler, aseto-orsein boyası ile boyanarak M II oranları EM grid grubunda % 20 (31/158), naylon mesh grubunda % 19 (24/128) ve vitrifiye edilmeyen kontrol grubunda % 70 (252/362) elde edilmiştir. Çalışmamızda M II oranları incelenmemiştir fakat polar body oranlarıyla değerlendirildiğinde, OPS grubunda % 23.19, SSV grubunda % 20.90 oranıyla Hurtt ve ark. (2000) ve Sharma ve Purohit'in (2008) 5.5 M EG ve 5.5 M DMSO gruplarına göre düşük, Sharma ve Purohit'in (2008) 4.5 M EG ve 4.5 M DMSO gruplarına ve Matsumoto ve ark. (2001) göre benzer bulunmuştur. Hurtt ve ark.'nın (2000) bulgularından farklı olmasının nedeni, Hurtt ve ark.'nın (2000) vitrifiye ettikleri hacmin (2 µl) çalışmamızda vitrifiye edilen hacme (OPS grubunda 5-10 µl, SSV grubunda 10-15 µl) göre daha küçük olması, soğutma oranını yükseltebileceğinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte Hurtt ve ark.'nın (2000) fikol kullanmasına da bağlı olabileceği düşünülmektedir. Sharma ve Purohit'in (2008) bulgularından farklı olmasının nedeni, Sharma ve Purohit'in (2008) vitrifiye ettiği hacmin (1-2 µl) çalışmamızdaki hacme göre daha küçük olduğundan dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamızdaki kontrol grubunda elde ettiğimiz % 78.83 polar body atma oranıyla değerlendirildiğinde, Hurtt ve ark. (2000), Sharma ve Purohit (2008) ve Matsumoto ve ark.'na (2001) benzer bulunmuştur. Kontrol grubu IVM

oranlarının benzer olması, laboratuvarımızdaki in vitro maturasyon standardının sunulan çalışmalara benzer olduğu düşünülmektedir.

Vajta ve ark.'nın (1998), vitrifiye edilmiş sığır oositlerinin gelişim kapasitesinin, klasik payet yöntemine göre OPS kullanılarak geliştirilebileceğini doğrulamaktadır. Açık uçlu modifiye payetin ucu, küçük çaplı ve ince bir çepere sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle çok küçük bir hacimdeki vitrifikasyon solüsyonu ile OPS içinde tutulan oositler, klasik payete (2.500°C/dk) göre daha hızlı bir soğuma ve ısınma oranına (teorikte 20.000°C/dk 'lik bir oran) erişirler (Rall ve Fahy, 1985; Vajta ve ark., 1998) ve iğlere zarar veren kritik sıcaklığı (15°C ila -15°C) hızla geçebilir (Martino ve ark., 1996b). Sharma ve Purohit (2008) OPS payetini direk çözdürme solüsyonunda çözdürülmesinin kritik sıcaklık aralığını hızlı geçmesini sağladığını, klasik payetin su banyosunda çözdürülmesinin ise kritik sıcaklık aralığının geçilmesinde OPS'ye göre daha uzun süre aldığını bildirmiştir.

Wu ve ark. (2017b), immatür sığır oositlerini OPS payetlerinde, % 20 EG + % 20 DMSO + % 17.1 sükröz içeren vitrifikasyon solüsyonunu kullanarak sıvı azot ve % 17.5 EG + % 17.5 DMSO + % 17.1 sükröz içeren vitrifikasyon solüsyonunu kullanarak sıvı helyumda vitrifiye etmişlerdir. Araştırmacılar IVM sonrası oositlerin polar body atma oranlarının sıvı azot grubunda % 48 (123/258), sıvı helyum grubunda % 51 (134/263) ve vitrifiye edilmeyen kontrol grubunda ise % 73.2 (178/250) olduğunu bildirmişlerdir. Yu ve ark. (2016), immatür sığır oositlerini OPS payetlerinde, % 20 EG + % 20 DMSO + 0.5 M sükröz içeren vitrifikasyon solüsyonunu kullanarak sıvı azotta ve sıvı helyumda vitrifiye etmişlerdir. Araştırmacılar IVM sonrası oositlerin polar body atma oranlarının sıvı azot grubunda % 43.4 (133/306), sıvı helyum grubunda % 52.8 (172/326) ve vitrifiye edilmeyen kontrol grubunda ise % 75 (224/299) olduğunu bildirmişlerdir. Chen ve ark. (2014), immatür sığır oositlerini OPS payetlerinde, % 20 DMSO + % 20 EG + 0.5 M sükröz içeren vitrifikasyon solüsyonunu kullanarak sıvı azot ve sıvı helyumda vitrifiye etmişlerdir. Araştırmacılar IVM sonrası oositlerin polar body atma oranlarının sıvı azot grubunda % 42.6 (108/247), sıvı helyum grubunda % 50.6 (147/292) ve vitrifiye edilmeyen kontrol grubunda ise % 69.5 (192/271) olduğunu bildirmişlerdir. Çetin

(2004), immatür sığır oositlerini % 40 EG / % 20 EG+ % 20 DMSO/ % 40 DMSO olmak üzere 3 farklı kriyoprotektan ile 1 M sükröz kullanarak payet içinde vitrifiye etmiştir. Araştırmacı, IVM sonrasında polar body atma oranlarının EG grubunda % 31.65 (44/139), EG+DMSO grubunda % 13.30 (25/188), DMSO grubunda % 7.59 (11/145) ve vitrifiye edilmeyen kontrol grubunda ise % 74.76 (77/103) olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızdaki OPS grubunda % 23.19, SSV grubunda % 20.90 oranında polar body atılmasıyla, Wu ve ark. (2017b), Yu ve ark. (2016) ve Chen ve ark.'na (2014) göre düşük, Çetin'in (2004) EG grubuyla benzer, Çetin'in (2004) EG+DMSO ve DMSO gruplarından yüksek bulunmuştur. Wu ve ark. (2017b), Yu ve ark. (2016) ve Chen ve ark.'nın (2014) bu oranı yüksek bulması, vitrifiye edilen hacmin çok küçük olmasından ve kriyojen olarak sıvı azottan daha yüksek soğutma hızı sağlayan sıvı helyumun kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çetin'in (2004) bu oranı düşük bulması, çalışmamızda klasik payete göre daha yüksek soğutma oranı sağlayan OPS payetini ve SSV damlacıklarını kullandığımızdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamızdaki kontrol grubunda % 78.83 oranında polar body atılmasıyla, Wu ve ark. (2017b), Yu ve ark. (2016), Chen ve ark. (2014), ve Çetin'e (2004) göre benzer bulunmuştur.

Vitrifiye oositlerin gelişim kabiliyetindeki azalma, ozmotik hasara ve kriyoprotektanların toksik etkilerine bağlı olabilir. Buna ek olarak, kromozomlar ve diğer sitoplazmik yapılar üzerinde zararlı etkilerinin olma olasılığı göz ardı edilemez, çünkü bu tür etkiler fare (Van der Elst ve ark., 1988) ve insan (Pickering ve ark., 1990 ve Park ve ark., 1997) oositlerin kriyoprezervasyonu sırasında gösterilmiştir. Donma ve çözündürme işleminin, hücre içi lipidlerde fiziko-kimyasal özelliklerinde değişimi indüklediği bilinmektedir (Isachenko ve ark., 2001; Kim ve ark., 2001) ve bu değişimlerin sonucunda meydana gelen hasarlar, oositin gelişimsel yeterliliğini korunmasını engelleyebilir. Donma sırasında kriyoprotektanların koruyucu etkilerine rağmen kriyoprotektan konsantrasyonu, zaman ve sıcaklığa bağlı olarak toksik etkili olabilirler (Fahy ve ark., 1990).

Sripunya ve ark. (2014), immatür sığır oositlerini % 20 DMSO, % 20 EG, 0.5 mol/l sükröz içeren vitrifikasyon solüsyonunu kullanarak kriyotop (CT) ve SSV ile vitrifiye etmişlerdir. CT ve SSV grupları, sitokalasin B uygulanan (CB+) ve

uygulanmayan (CB-) olarak iki alt gruplara ayrılarak vitrifikasyon yöntemleri üzerine sitokalsin B'nin etkisi araştırılmıştır. IVM sonrasında aseto-orsein ile boyandığında, polar body ve metafaz plağı görülen oositler, M II aşaması olarak kabul edilmiştir. Araştırmacılar değerlendirmede CT (CB+) grubunda % 57 (81/142), CT (CB-) grubunda % 58 (88/151), SSV (CB+) grubunda % 63 (83/132), SSV (CB-) grubunda % 60 (83/139), kontrol grubunda ise % 81 (113/140) oranında M II aşamasına gelmiş oosit elde etmişlerdir. Liang ve ark. (2012), immatür buffalo oositlerini % 20 DMSO, % 20 EG, 0.5 mol/l sükröz içeren vitrifikasyon solüsyonunu kullanarak CT ve SSV ile vitrifiye etmişlerdir. CT ve SSV grupları üzerine sitokalsin B'nin etkisi araştırmak amacıyla vitrifikasyon yöntemlerini sitokalsin B uygulanan (CB+) ve uygulanmayan (CB-) olarak iki alt gruplara ayrılmıştır. IVM sonrasında aseto-orsein ile boyandığında, polar body ve metafaz plağı görülen oositler, M II aşaması olarak kabul edilmiştir. Araştırmacılar değerlendirmede CT (CB+) grubunda % 22 (23/106), CT (CB-) grubunda % 32 (35/110), SSV (CB+) grubunda % 13 (11/88), SSV (CB-) grubunda % 23 (21/91), kontrol grubunda ise % 55 (60/109) oranında M II aşamasına gelmiş oosit elde etmişlerdir. Çalışmamızda M II plağı incelenmemiştir fakat polar body oranlarıyla değerlendirildiğinde, OPS grubunda % 23.19, SSV grubunda % 20.90 oranıyla Sripunya ve ark.'na (2014) göre düşük, Liang ve ark.'na (2012) göre benzer bulunmuştur. Sripunya ve ark. (2014) bulgularından farklı olmasının nedeni, CT (< 0.1 µl) ve SSV (2 µl) gruplarında vitrifiye edilen hacimlerin çalışmamıza göre çok küçük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda OPS ve SSV vitrifikasyon yöntemlerinde kullanılan vitrifikasyon 1 solüsyonlarında (OVS 1 ve SSV 1) oositler manipüle edilirken herhangi bir sorunla karşılaşmadı. OPS ve SSV vitrifikasyon 2 solüsyonlarının (OVS 2 ve SSV 2) yoğunluğundan dolayı oositler solüsyon yüzeyine çıktı ve oositlerin solüsyon ile karıştırılmasında güçlükler yaşandı.

Kısa sürede OPS (20 sn) payetine ve SSV (30 sn) damlasına 2-4 oosit yüklenerek vitrifiye edildi. Birçok yapılan OPS ve SSV çalışmalarında 7 den az oosit kullanılmıştır. Her iki yöntemde az sayıda oosit kullanılması, vitrifikasyon için avantaj oluşturabileceği düşünülmüştür.

Çözdürme işlemi için sıvı azottan çıkarılan OPS payetlerinin ve SSV damlacıkların cam halini korudukları ve bulutlanma görünümü oluşmadığı görüldü.

Maturasyon sonrasında kumulus ekspansiyonu değerlendirildiğinde OPS (% 80.82) ve SSV (% 78.47) vitrifikasyon grupları arasında önemli fark ( $p>0.05$ ) bulunmamıştır. Vitrifikasyon gruplarının kumulus ekspansiyon oranları, kontrol (% 96) grubuna göre önemli derecede ( $p<0.001$ ) düşük bulunmuştur.

Çözdürme işleminde OPS payetleri ve SSV damlacıklarının sıvı azottan çıkarılıp çözdürme solüsyonuna aktarılincaya kadar havada geçen süre 5 sn idi. Maturasyon sonrasında kumulus hücrelerinden soyulan oositler incelendiğinde, OPS ve SSV gruplarında zona pelusida kırılması görülmemesi, önceki çalışmaları destekler niteliktedir. Bu yüzden OPS payetlerini ve SSV damlacıklarını çözdürmeden önce havada kısa süre geçirmesinin avantaj oluşturabileceği düşünülmektedir.

Maturasyon sonrasında perivitellin boşluğa 1. polar body atılması değerlendirildiğinde OPS (% 23.19) ve SSV (% 20.90) vitrifikasyon grupları arasında önemli fark ( $p>0.05$ ) bulunmamıştır. Vitrifikasyon gruplarının polar body oranları, kontrol (% 78.83) grubuna göre önemli derecede ( $p<0.001$ ) düşük bulunmuştur.

Çalışmamızdaki OPS ve SSV gruplarında 1. polar body atma oranlarının diğer çalışmalara göre düşük olması, vitrifikasyon işleminde kullandığımız hacmin (OPS'de 5-10 µl, SSV'de 10-15 µl) diğer çalışmalara (OPS ve SSV 1-2 µl) göre yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, immatür sığır oositlerinin OPS ve SSV vitrifikasyon yöntemleri ile vitrifiye edilebileceği gösterilmiştir. SSV yönteminde oluşturulan damlacıklar metal küp üzerine damlatıldığında birkaç parçaya ayrılabilirdi gözlemlendi. Ayrılan damlaların bazıları ise metal küp üzerinden sıvı azot içine düştü ve damlaların soğutulmuş pens ile alınarak kriyotüp içerisine konulması işleminde güçlükler yaşandı. Bu nedenlerden dolayı OPS yöntemi SSV yöntemine göre daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Vitrifikasyon işleminin kolaylığı ve güvenilirliği bakımından OPS yöntemi önerilmektedir.

Son zamanlarda geliştirilen vitrifikasyon yöntemlerinde soğutma oranının artırılması hedeflenmiştir. Soğutma oranını arttırmak amacıyla özellikle vitrifiye edilen solüsyonun hacmi küçültülmüştür. Vitrifikasyon sonuçlarının daha başarılı olması için vitrifikasyonda kullanılan hacmin olabildiğince küçük olmasına (< 1 µl) özen gösterilmesi önerilmektedir. Bununla birlikte soğutma oranını arttırmak amacıyla geliştirilen vitrifikasyon yöntemlerinin kullanılması ile immatür sığır oositlerinde daha başarılı vitrifikasyon sonuçları elde edilebilir.

## KAYNAKLAR

- Abe Y, Hara K, Matsumoto H, Kobayashi J, Saada H, Ekwall H, Martinez HR, Sato E (2005).** Feasibility of a nylon mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol Reprod.*, **72**, 1416-1420.
- Al-Hasani S, Kirsh J, Diedrich K, Blanke S, Van Der Ven H, Krebs D (1989).** Successful embryo transfer of cryopreserved and in vitro fertilized rabbit oocytes. *Hum Reprod.*, **4**, 77-79.
- Aksu ZN (2010).** *Arı sütü ve buzağı serumunun sığır oositlerinin vitfirikasyonu ve olgunlaşması üzerine etkilerinin araştırılması.* Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
- Akyol N (2006).** Sığırlarda in vitro oosit maturasyonu. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg.*, **46** (1), 59 – 69.
- Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB (2010).** Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Hum Reprod.*, **25**, 2999–3011.
- Alçolak E (2009).** *Polikistik over sendromlu hastalarda in-vitro maturasyon, vitirifikasyon ve dondurm-çözme kombinasyonunun başarılı implantasyon oranına etkisi.* Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans, Adana.
- Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Paixao CL, Pereira PC (2010).** Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum Reprod.*, **25**, 1192-1198.
- Alvarenga MA, Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM (2000).** Acrozomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Equine Vet J*, **32**, 541-545.
- Anchamparuthy V (2007).** *Vitrification of bovine oocytes.* PhD Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Anchamparuthy VM, Pearson RE, Gwazdauskas, FC (2010).** Expression pattern of apoptotic genes in vitrified-thawed bovine oocytes. *Reproduction in domestic animals*, **45** (5), 83-90.

**Anonim (2007).** Manual for Ovum Pick-Up and In Vitro Fertilization –Japan– Embryo Transfer Technology for Domestic Animal.

**Anonim(2016).**<http://www.rotalab.com/tr/urunler/laboratuvar-kabinleri/laminar-akis-steril-kabin.html>. Erişme tarihi: 10.12.2016.

**Anonim(2017).**[https://www.google.com.tr/search?q=cryotop&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=2ahUKEwiZ38fRxMLeAhXwk4sKHcDuBV4QsAR6BAgFEAE&biw=1024&bih=489#imgrc=WvXkKVF\\_WDW2IM](https://www.google.com.tr/search?q=cryotop&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=2ahUKEwiZ38fRxMLeAhXwk4sKHcDuBV4QsAR6BAgFEAE&biw=1024&bih=489#imgrc=WvXkKVF_WDW2IM): Erişme tarihi: 24.08.2017.

**Aparicio IM, Garcia-Herreros M, O’Shea LC, Hensey C, Lonergan P, Fair T (2011).** Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod.*, **84**, 910–921.

**Arav A (2001).** Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology*, **55 (7)**, 1561-1565.

**Arav A (2014).** Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, **81**, 96-102.

**Arav A, Natan Y, Kalo D, Komsky-Elbaz A, Roth Z, Levi-Setti PE, Leong M, Patrizio P (2018).** A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet*, 1-8.

**Arav A, Rubinsky B, Fletcher G and Seren E (1993a).** Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Mol Reprod Dev.*, **36**, 488-493.

**Arav A, Rubinsky B, Seren E, Roche JF, Boland MP (1994).** The role of thermal hysteresis proteins during cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, **41 (1)**, 107-112.

**Arav A, Shehu D, Mattioli M (1993b).** Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fert.*, **99**, 353-358.

**Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H (2002).** New trends in gamete’s cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **187**, 77-81.

**Arav A, Zeron Y (1997).** Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology*, **47**, 341.



- Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Anderson GB, Crowe JH (1996).** Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology*, **33** (6), 589-599.
- Aree-uea A, Liang Y, Yoisungnern T, Parnpai R, Vutyavanich T (2016).** A Comparison of Open Cryotop Device and Hemi-Straw in Sealed Straw for Mouse Oocytes Vitrification. *Austin J In Vitro Fertil.*, **3** (1), 1029.
- Avery B, Hay-Schmidt A, Hyttel P, Greve T (1998).** Embryo development, oocyte morphology and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev.*, **50**, 334–344.
- Aydiner F (2008).** *Sperm kriyoprezervasyonu sonrasında apoptozun değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Bagis H, Mercan HO, Cetin S, Sekmen S (2005).** The effect of equilibration time on survival and development rates of mouse pronuclear-stage embryos vitrified in solid surface (SSV) and conventional straws: In vitro and In vivo evaluations. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **72** (4), 494-501.
- Barrett J (2001).** Thermal hysteresis proteins. *The international journal of biochemistry cell biology*, **33**, 105-117.
- Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinyess A, Keefer CL (2003).** Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solidsurface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology*, **59**, 1839-1850.
- Beker AR, Colenbrander B, Bevers MM (2002).** Effect of 17-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, **58**, 1663–1673.
- Bethapudi S (2017).** *Effect of cryopreservation on in vitro maturation and in vitro fertilization of buffalo oocytes*. PhD Thesis, P.V Narsimha Rao Telangana Veterinary University, India.
- Blondin P, Guilbault LA, Sirard MA (1997).** The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*, **48**, 803–813.

- Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, Succu S, Pau S, Ledda S (2007).** Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology*, **68**, 1138-1149.
- Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenheede JMM, de Kruif A (1996).** Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, **45** (5), 1001-1014.
- Boni R, Cuomo A, Tosti E (2002).** Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biology of Reproduction*, **66**, 836–842.
- Booth PJ, Vajta G, Hoj A, Holm P, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1999).** Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts: work in progress. *Theriogenology*, **51**, 999-1006.
- Bouquet M, Selva J, Aurox M (1995).** Effects of cooling and equilibration in DMSO, and cryopreservation of mouse oocytes, on the rates of in vitro fertilization, development and chromosomal abnormalities. *Mol Reprod Dev.*, **40**, 110-115.
- Brevini Gandolfi TAL, Gandolfi F (2001).** The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, **55**, 1255–1276.
- Callesen H, Greve T, Hyttel P (1986).** Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, **43**, 71-86.
- Camus A, Clairaz P, Ersham A, van Kappel AL, Savić G, Staub C (2006).** Principe de la vitrification: cinétiques comparatives, The comparison of the process of five different vitrification devices. *Gynécologie Obst. Fertil.*, **34**, 737–745.
- Carroll J, Depypere H, Matthews CD (1990).** Freeze-thaw-induced changes in the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocyte. *J Reprod Fert.*, **90**, 547–553.
- Carroll J, Wood MJ, Whittingham DG (1993).** Normal fertilization of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules, *Biol Reprod.*, **48**, 606-612.

- Cecim M, Kerr J, Bartke A (1995).** Infertility in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene: luteal failure secondary to prolactin deficiency. *Biology of Reproduction*, **52** (5), 1162-1166.
- Channing CP, Hillensjo T, Schaerf FW (1978).** Hormonal control of oocyte meiosis, ovulation and luteinization in mammals. *Clin Endocrinol Metab.*, **7**, 601-624.
- Chauhan MS, Katiyar PK, Madan ML, Singla SK, Manik RS (1996).** Influence of follicle stimulating hormone on in vitro maturation and cleavage of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes after in vitro fertilization. *Theriogenology*, **45**, 243.
- Chen C (1986).** Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet.*, **1**, 884-886.
- Chen JY, Li XX, Xu YK, Wu H, Zheng JJ, Yu XL (2014).** Developmental competence and gene expression of immature oocytes following liquid helium vitrification in bovine. *Cryobiology*, **69** (3), 428-433.
- Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW, Yang YS (2006).** Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod.*, **21** (11), 2794-2800.
- Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS (2000).** Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum. Reprod.*, **15**, 2598-2603.
- Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS (2001).** Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod.*, **16** (11), 2350-2356.
- Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM, Tan SL (2005).** High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertil. Steril.*, **84**, 36.
- Cho HJ, Son WY, Yoon SH, Lee SW, Lim JH (2002).** An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Hum. Reprod.*, **17**, 2419-2422.

- Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A (2004).** What Criteria for the Definition of Oocyte Quality?. *Ann N Y Acad Sci.*, **1034**, 132-144.
- Critser JK, Agca Y, Gunasena KT (1997).** The cryobiology of mammalian oocytes. In: Karow A, Critser J. (eds) *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*. Academic Press, San Diego, p: 329-357.
- Crowe J, Crowe L, Mouradian R (1983).** Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiology*, **20 (3)**, 346-356.
- Çetin Y (2004).** *İmmatür sığır oositlerinin vitrifikasyon tekniği ile etilen glikol ve DMSO kullanarak payetlerde dondurulması*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Das SK, Chauhan MS, Palta P, Tomer OS (1997).** Influence of cumulus cells on in vitro maturation of denuded buffalo oocytes. *Vet Rec.*, **141**, 522-523.
- De Loos FA, Zeinstra E, Bevers MM (1994).** Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro. *Mol Reprod Dev.*, **39**, 162-5.
- Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P (2000).** Post-vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. *Animal Reproduction Science*, **63 (3-4)**, 159-165.
- Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ (2007).** Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *Journal of Cell Science*, **120 (8)**, 1330-1340.
- Dieleman SJ, Kruip TAM, Fontijne P, de Jong WHR, van der Weyden GC (1983).** Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentration in follicular fluid and in micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J Endocrinol.*, **97**, 31-42.
- Diez C, Duque P, Gómez E, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodríguez A, Fernandez L, de la Vargab S, Fernandez A, Facal N, Carbajo M (2005).** Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*, **64**, 317-333.
- Diez C, Heyman Y, Le Bourhis D, Guyader-Joly C, Degrouard J, Renard JP (2001).** Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. *Theriogenology*, **55 (4)**, 923-936.

**Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X (2000).** High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.*, **63**, 513-518.

**Doğan S (2015).** *Stimüle edilmiş hastalardan elde edilen immatür oositlerde in vitro maturasyon ve kümülüslerindeki apoptotik farklılıkların değerlendirilmesi.* Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

**Downs SM, Gilles R, Vanderhoef C, Humpherson PG, Leese HJ (2006).** Differential response of cumulus cell- enclosed and denuded mouse oocytes in a meiotic induction model system. *Mol Reprod Dev.*, **73**, 379-389.

**Duran DH (2000).** Technical aspect of in vitro embryo production. Erişim adresi: [http://www.fftc.agnet.org/htmlarea\\_file/library/20110801170413/tb152.pdf](http://www.fftc.agnet.org/htmlarea_file/library/20110801170413/tb152.pdf). Erişim tarihi: 30.4.2018.

**Ebrahimi B, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Baharvand H (2010a).** In vitro maturation, apoptotic gene expression and incidence of numerical chromosomal abnormalities following cryotop vitrification of sheep cumulus-oocyte complexes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **27 (5)**, 239-246.

**Ebrahimi B, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Baharvand H, Farrokhi A (2010b).** IVM and gene expression of sheep cumulus–oocyte complexes following different methods of vitrification. *Reproductive biomedicine online*, **20 (1)**, 26-34.

**Elbarbary T (2004).** Cryopreservation par vitrification puis transplantation intra-uterine de tissu ovarien. Doktora Tezi, Geneve Üniversitesi, Mısır.

**Eppig JJ, O'brien MJ, Wigglesworth K, Nicholson A, Zhang W, King BA (2009).** Effect of in vitro maturation of Mouse oocytes on the health and lifespan of adult offspring. *Hum Reprod.*, **24**, 922–928.

**Eroglu A, Toner M, Leykin L, Toth TL (1998a).** Cytoskeleton and polyploidy after maturation and fertilization of cryopreserved germinal vesicle-stage mouse oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **15 (7)**, 447-454.

**Eroglu A, Toth TL, Toner M (1998b).** Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril.*, **69**, 944-957.

- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, Magrini O, Seracchioli R, Venturoli S, Flamigni C (2000).** Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **169**, 39–42.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C (2001).** Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Human reproduction*, **16 (3)**, 411-416.
- Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MSJ, Meryman HT (1990).** Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, **27 (3)**, 247-268.
- Fortune JE, Hansel W (1985).** Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol. Reprod.*, **32**, 1069–1079.
- Fu XW, Shi WQ, Zhang QJ, Zhao XM, Yan CL, Hou YP, Zhou GB, Fan ZQ, Suo L, Wusiman A, Wang YP, Zhu SE (2009).** Positive effects of Taxol pretreatment on morphology, distribution and ultrastructure of mitochondria and lipid droplets in vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Animal reproduction science*, **115**, 158-168.
- Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ, Downey BR (1992).** In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, **29 (4)**, 485-492.
- Fuku E, Liu J, Downey BR (1995).** In vitro viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. *Mol Reprod Dev.*, **40**, 177-185.
- Fukui Y, Fukushima M, Terawaki Y, Ono H, (1982).** Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*, **18**, 161–175.
- Fukushima M, Fukui Y (1985).** Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro. *Anim Reprod Sci.*, **9**, 323–332.
- Gilchrist RB (2011).** Recent insights into oocyte - follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reproduction Fertility Development*, **23**, 23–31.

- Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK (2000).** Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod.*, **15**, 335-343.
- Gordon I (2003).** *Laboratory production of cattle embryos*. Vol. 27, 2<sup>nd</sup> Edition, CABI Publishing, p: 112-302.
- Gosden R, Nagano M (2002).** Preservation of fertility in nature and ART. *Reproduction*, **123** (1), 3-11.
- Gosden RG (2005).** Prospects for oocyte banking and in vitro maturation. *J Natl Cancer Inst Monogr.*, **43**, 60-63.
- Goud A, Goud P, Qian C, Van der Elst J, Van Maele G, Dhont M (2000).** Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured M II oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions. *Fertility and sterility*, **74** (3), 487-494.
- Guimaraes AL, Pereira SA, Leme LO, Dode MA (2015).** Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation (SPOM) system for improving bovine in vitro embryo production. *Theriogenology*, **83**, 52–57.
- Gümüş E (2014).** *Vitrifikasyon ve ototransplantasyon sonrasında fare ovaryum dokusunun morfoloji ve üreme potansiyeli açısından değerlendirilmesi*. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Hamano S, Koikeda A, Kuwayama M, Nagai T (1992).** Full-term development of in vitro matured vitrified and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, **38**, 1085-1090.
- Hansen TR, Randel RD, Welsh TH (1988).** Granulosa cell steroidogenesis and follicular fluid steroid concentrations after the onset of oestrus in cows. *J Reprod Fertil.*, **84**, 409–416.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Imai H (2002).** Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. *Biology of Reproduction*, **66**, 1696–1701.
- Hendricksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers MM, Dielman SJ (2000).** Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology*, **53**, 11–20.

- Hershey JWB (1991).** Translational Control in Mammalian Cells. *Annu Rev Biochem.*, **60** (1), 717-755.
- Holm C (2003).** Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions*, **31** (6), 1120-1124.
- Holt WV, Pickard AR, Prather RS (2004).** Wildlife conservation and reproductive cloning. *Reproduction*, **127** (3), 317-324.
- Hunter AG, Moor RM (1987).** Stage dependent effects of inhibiting RNA and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *J Dairy Sci.*, **70**, 1646-1651.
- Hurt AE, Landim-Alvarenga F, Seidel GE, Squires EL (2000).** Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*, **54** (1), 119–128.
- Hussein MR (2005).** Apoptosis in the ovary: molecular mechanism. *Hum Reprod Update.*, **11**, 162-178.
- Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB (2005).** Oocyte prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine of bone gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci.*, **118**, 5257-5268.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T (1997).** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, **47**, 23–32.
- Hyttel P, Vajta G, Callesen H (2000).** Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. *Molecular Reproduction and Development*, **56**, 80-88.
- Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T (1986).** Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil.*, **78**, 615-625.
- Im KS, Kang JK, Kim HS (1997).** Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. *Theriogenology*, **47** (4), 881-891.
- Imoedemhe DG, Sigue AB (1992).** Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus cells in 1, 2 propanediol. *J Assist Reprod Genet.*, **9**, 323-327.



**Isachenko V, Folch J, Isachenko E, Nawroth F, Krivokharchenko A, Vajta G, Dattena M, Alabart JL (2003).** Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology*, **60**, 445-452.

**Isachenko V, Isachenko E, Michelmann HW, Alabart JL, Vazquez I, Bezugly N, Nawroth F (2001).** Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes. *Anat Histol Embryol.*, **30** (6), 333-338.

**Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F, Grishchenko V (1998).** Vitrification of immature porcine oocytes: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology*, **36**, 250-253.

**Jin JI, Ghanem N, Kim SS, Choi BH, Ha AN, Lee KL, Sun DW, Lim HT, Lee JG, Kong IK (2016).** Interaction of donor age, parity and repeated recovery of cumulus–oocyte complexes by ovum pick-up on in vitro embryo production and viability after transfer. *Livestock Science*, **188**, 43-47.

**Juengel JL, Bibby AH, Reader KL, Lun S, Quirke LD, Haydon LJ, McNatty KP (2004).** The role of transforming growth factor-beta (TGF-beta) during ovarian follicular development in sheep. *Reprod Biol Endocrinol.*, **2**, 78-88.

**Kartberg AJ, Hambiliki F, Arvidsson T, Stavreus-Evers A, Svalander P (2008).** Vitrification with DMSO protects embryo membrane integrity better than solution without DMSO, *Reproductive BioMedicine Online*, **17**, 378-384.

**Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH, Kruip TAM (1990).** Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J Reprod Fertil.*, **90**, 305-310.

**Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH, Kruip TAM (1991).** Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Mol Reprod Dev.*, **29**, 271-275.

**Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P (1998).** Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, **37**, 325-338.

**Kawashima I, Okazaki T, Noma N, Nishibori M, Yamashita Y, Shimada M (2008).** Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for

appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. *Reproduction*, **136**, 9–21.

**Kaymaz M (2015).** *Yardımcı üreme teknikleri*. In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A (Eds), *Çiftlik hayvanlarında doğum ve jinekoloji*. Medipres, 2. baskı, Malatya, s: 703-704.

**Kim JH, Niwa K, Lim JM, Okuda K (1993).** Effects of phosphate, energy substrates, and amino-acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture-medium. *Biol Reprod.*, **48**, 1320–1325,

**Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y (2001).** Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction*, **122** (1), 131-138.

**Knight CA, DeVries AL, Oolman LD (1984).** Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. *Nature*, **308**, 295–296.

**Knight CA, Duman JG (1986).** Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: A possible cryoprotective role. *Cryobiology*, **23**, 256–262.

**Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H (1994).** Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *Reproduction*, **100**, 439–446.

**Koçyiğit A (2014).** *Sığır embriyosunun in vitro üretimi ve vitrifikasyonunda sitokin (LIF) ve büyüme faktörünün (IGF-1) etkileri*. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

**Kono T, Kwon OY, Nakahara T (1991).** Development of vitrified mouse oocytes after IVF. *Cryobiology*, **28**, 50-54.

**Krisher RL (2004).** The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci.*, **82**, 14-23.

**Kubelka M, Motlik J, Fulka JJ, Prochazka R, Rimkevichova Z, Fulka J (1988).** Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gam Res.*, **19**, 423-431.

- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A (1999).** Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum Reprod.*, **14**, 3077-3079.
- Kuleshova LL, Lopata A (2002).** Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril.*, **78 (3)**, 449-454.
- Kumar Paul A (2014).** *Development of a novel device and improved techniques for bovine oocytes and embryos vitrification.* Ph.D. Thesis, Suranaree University of Technology, Thailand.
- Kumar S (2007).** Cryopreservation of buffalo oocytes by slow freezing and vitrification. Ph.D. Thesis, Deemed University, India.
- Kuwayama M (2007).** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, **67**, 73–80.
- Kuwayama M, Kato O (2000).** All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Gene.*, **17 (8)**, 477.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O (2005a).** Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online.*, **11 (5)**, 608-614.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP (2005b).** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online.*, **11 (3)**, 300-308.
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT (1999).** Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nature Biotechnology*, **17**, 1234-1236.
- Lane M, Gardner OK (2001).** Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol Reprod Devel.*, **58**, 342-347.
- Larman MG, Gardner DK (2010).** Vitrifying Mouse oocytes and embryos with super-cooled air. *Hum Reprod.*, **25**, 265-266.
- Le Gal F, De Roover R, Verhaeghe B, Etienne D, Massip A (2000).** Development of vitrified matured cattle oocytes after thawing and culture in vitro. *Vet Rec.*, **146**, 469-471.
- Le Gal F, Massip A (1999).** Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology*, **38**, 290-300.

- Leeuw FED, Leeuw AMD, Daas JHG, Colenbrander BV, Verkleij AJ (1993).** Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, **30**, 32-44.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eystone WH, Northey DL, First NL (1987).** Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod.*, **36**, 376–383.
- Leibo SP (1986).** Cryobiology: preservation of mammalian embryos. *Basic Life Sci.* **37**, 251-272.
- Leibo SP, N Songsasen (2002).** Cryopreservation of gametes and embryos of non domestic animals. *Theriogenology*, **57**, 303-326.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL (1983).** In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biol Reprod.*, **29**, 173–179.
- Li Q, Jimenez-Krassel F, Bettegowda A, Ireland JJ, Smith GW (2007).** Evidence that the preovulatory rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle. *J Endocrinol.*, **192**, 473–483.
- Li X, Su L, Li Y, Ji W, Dinnyes A (2002).** Vitrification of yunan yellow cattle oocytes: work in progress. *Theriogenology*, **58**, 1253-1260.
- Liang Y, Rakwongrit D, Phermthai T, Somfai T, Nagai T, Parnpai R (2012).** Cryopreservation of immature buffalo oocytes: Effects of cytochalasin B pretreatment on the efficiency of cryotop and solid surface vitrification methods. *Animal Science Journal*, **83**, 630-638.
- Liebermann J, Tucker MJ (2002).** Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*, **124**, 483-489.
- Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Levy MJ (2002).** Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the flexipet denuding pipette. *Reprod Biomed Online.*, **4 (2)**, 146-150.
- Lim JM, Fukui Y, Ono H (1991).** The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*, **35 (6)**, 1225-1235.

- Lim JM, Fukui Y, Ono H (1992).** Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*, **37**, 351-361.
- Lim JM, Ko JJ, Hwang WS, Chung HM, Niwa K (1999).** Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. *Theriogenology*, **51**, 1303-1310.
- Lin TK, Su JT, Lee FK, Lin YR, Lo HC (2010).** Cryotop vitrification as compared to conventional slow freezing for human embryos at the cleavage stage: survival and outcomes. *Taiwan J Obstet Gynecol*, **49 (3)**, 272-278.
- Liu JM, Jin ZQ, Zhao XX, Zhu YD (1991).** *The development of bovine follicular oocytes matured in different culture media.* *Veterinary Research Communications*, **15**, 257-260.
- Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Yang X, Boland M (2000).** Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Molecular Reproduction and Development*, **57**, 204–209.
- Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P (1997).** Bovine blastocyst production in vitro following inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *Journal of Reproduction and Fertility*, **109**, 355–365.
- Lorv JSH, Rose DR, Glick BR (2014).** Bacterial ice crystal controlling proteins. *Scientifica*, **2014**, 1-20.
- Luciano AM, Pocar P, Milanese E, Modena S, Rieger D, Lauria A, Gandolfi F (1999).** Effect of different levels of intracellular cAMP on the in vitro maturation of cattle oocytes and their subsequent development following in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev.*, **54**, 86–91.
- Luster SM (2004).** *Cryopreservation of bovine and caprine oocytes by vitrification.* Master's Theses, Louisiana State University. Louisiana.
- Luyet BJ, Gehenio PM (1940).** *Life and death at low temperatures.* Biodynamica Publishing, Normandy.
- Madan ML, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS (1994).** In vitro production and transfer of embryos in buffaloes. *Theriogenology*, **41**, 139-143.

- Mahesh YU, Gibence HRW, Shivaji S, Rao BS (2017).** Effect of different cryo-devices on in vitro maturation and development of vitrified-warmed immature buffalo oocytes. *Cryobiology*, **75**, 106-116.
- Mahmoud KGHM, El-Sokary MMM (2013).** Improvement of the efficacy of buffalo oocytes vitrification. *Glob Vet.*, **11**, 420-431.
- Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE (2016).** Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*, **86** (7), 1637-1644.
- Martino A, Pollard JW, Leibo SP (1996a).** Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **45** (4), 503-512.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP (1996b).** Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod.*, **54**, 1059-1069.
- Massip A (2001).** Cryopreservation of embryos of farm animal, *Reprod Dom Anim.*, **36**, 49-55.
- Massip A, Van Der Zwalmen P, Ectors F (1987).** Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, **27** (1), 69-79.
- Masui Y, Clarke HJ (1979).** Oocyte maturation. *Int Rev Cytol.*, **57**, 185-282.
- Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H ve Sato E (2001).** Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, **42**, 139-144.
- Matsumoto H, Shoji N, Sugawara S, Umezu M, Sato E (1998).** Microscopic analysis of enzyme activity, mitochondrial distribution and hydrogen peroxide in tow cell rat embryos. *J Reprod Fertil.*, **113**, 231-238.
- Matsunari H, Maehara M, Nakano K, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Ohta H, Takahashi M, Nagashima H (2012).** Hollow fiber vitrification: A novel method for vitrifying multiple embryos in a single device. *J Reprod Dev.*, **58** (5), 599-608.
- Mavrides A, Morroll D (2002).** Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete?. *Reprod Nutr Dev.*, **42**, 73-80.

- Mayes M (2002).** *The meiotic arrest of bovine oocytes.* PhD Thesis, University of Laval, Canada.
- Mayes MA, Sirard MA (2001).** The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*, **55**, 911-922.
- Mazur P (1963).** Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol.*, **47**, 347-369.
- Mazur P (2004).** *Principles of cryobiology.* In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE (Eds), *Life in the frozen state*, CRC Press, Boca Raton, Florida, p:3-65.
- Men H, Agca Y, Riley LK, Critser JK (2006).** Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology*, **66**, 2008–2016.
- Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ (2003).** Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology*, **47** (1), 73-81.
- Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L (2000).** High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol Reprod Dev.*, **55**, 89–95.
- Mingoti GZ, Garcia JM, Rosa-e-Silva AA (2002).** Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Anim Reprod Sci.*, **69**, 175–186.
- Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T (1993).** Vitrification of Mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology*, **40**, 121-134.
- Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J (1998).** Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update.*, **4** (3), pp. 223-36.
- Moor RM, Polge C, Willadsen SM (1980).** Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes. *J Embryol Exp Morphol.*, **56**, 319–335.
- Morita Y, Tilly JL (1999).** Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev bio.*, **213** (1), 1-17.

- Mullen SF (2007).** *Advances in the fundamental cryobiology of mammalian oocytes.* PhD Thesis. University of Missouri, Columbia.
- Muthukumar K, Mangalaraj AM, Kamath MS, George K (2008).** Blastocyst cryopreservation: vitrification or slow freeze. *Fertil Steril.*, **90**, 426–427.
- Nagai T (2001).** The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, **55**, 1291–1301.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman R, Grupen C, Seamark RF (1994).** Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology*, **41**, 113-118.
- Nakagata N (1989).** High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fert.*, **87**, 479-483.
- Nakagata N (1992).** Cryopreservation of unfertilized rat oocytes by ultrarapid freezing (in Japanese). *Exper Anim.*, **41**, 443-447.
- Nandi S, Chauhan MS, Palta P (1998).** Influence of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, **50 (8)**, 1251-1262.
- Nowshari MA, Nayudu PL, Hodges JK (1994).** Effect of cryoprotectant concentration, equilibration time and thawing procedure on survival and development of rapid frozen-thawed mature mouse oocytes. *Theriogenology*, **42**, 1193-1204.
- Oberstein N, O'donovan MK, Bruemmer JE, Seidel GE, Carnevale EM, Squires EL (2001).** Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, **55 (2)**, 607-613.
- Orief Y, Schultze-Mosgau A, Dafopoulos K, Al-Hasani S (2005).** Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques?. *Middle East Fertility Society Journal*, **10 (3)**, 171-184.
- Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki T (1992).** Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation *in vitro* and of frozen-thawed bovine embryos derived from frozen mature oocytes. *Theriogenology*, **38**, 711-719.
- Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki T (1993).** Developmental capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants. *Theriogenology*, **40**, 801-807.



- Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Takagi M, Suzuki T (1994).** Developmental competence of bovine oocytes frozen at different cooling rates. *Cryobiology*, **31**, 344-348.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T (1997).** Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. *Cryobiology*, **34** (1 ), 36-41.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T (1998).** Cryopreservation of Mature Bovine Oocytes by Vitrification in Straws. *Cryobiology*, **37**, 77-85.
- Ozkavukcu S, Erdemli E (2002).** Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara medical school*, **24** (4), 187-196.
- Özatic O (2011).** *IVF laboratuvarı ve uygulamaları*. 1. Baskı, Abacılar Ofset Matbaacılık, s:134, Isparta.
- Palasz AT, Mapletoft RJ (1996).** Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, **14** (2), 127-149.
- Papis K, Shimizu M, Izaike Y (2000).** Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, **54**, 651-658.
- Park SE, Chung HM, Cha KY, Hwang WS, Lee ES, Lim JM (2001).** Cryopreservation of ICR Mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxol™, a cytoskeleton stabilizer. *Fertil Steril.*, **75** (6), 1177-1184.
- Park SE, Son WY, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY (1997).** Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil Steril.*, **68** (5), 920-926.
- Parkening TA, Tsunoda Y, Chang MC (1976).** Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J Exp Zool.*, **197**, 369-374.
- Parks JE, Ruffing NA (1992).** Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, **37**, 59-75.
- Paynter SJ (2000).** Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum Reprod Upd.*, **6** (5), 449-456.

- Peng XR, Hsueh AJW, Lapolt PS, Bjersing L, Ny T (1991).** Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*, **129**, 3200-3207.
- Petyim S, Makemahar O, Kunathikom S, Choavaratana R, Laokirkkiat P, Penparkkul K (2009).** The successful pregnancy and birth of a healthy baby after human blastocyst vitrification using Cryo-E, first case in Siriraj Hospital. *J Medical Assoc Thailand.*, **92 (8)**, 1116-1121.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J (1990).** Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil steril.*, **54 (1)**, 102-108.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip TA, Wurth YA, Van Beneden TH, Willemsse AH, Taverne MAM (1991).** Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, **35 (4)**, 857-862.
- Pincus G, Enzmann EV (1935).** The comparative behavior of mammalian eggs in vitro and in vivo. *J Exp Med.*, **62**, 665-675.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949).** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**, 666.
- Pollard JW, Leibo SP (1994).** Chilling sensitivity of mammalian embryos, *Theriogenology*, **4**, 101-106.
- Ponderato N, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Galli C, Lazzari G (2001).** Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. *Molecular Reproduction and Development*, **60**, 579–585.
- Porcu E (2001).** Oocyte freezing. *Sem Reprod Med.*, **19 (3)**, 221-230.
- Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Fratto R, Giunchi S, Venturoli S (2004).** Oocyte cryopreservation in oncological patients. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, **113**, 14-16.
- Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C (2000).** Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol.*, **169**, 33-37.

- Portmann M, Nagy ZP, Behr B (2010).** Evaluation of blastocyst survival following vitrification/warming using two different closed carrier systems, *Hum Reprod.*, **25**, 261.
- Pryor JH, Trant JA, Ponchirolli-Schneider CB, Looney CR, Long CR, Forrest DW (2009).** The use of forskolin and its effect on in vitro-produced brahman-sired embryos submitted to slow cool freezing or vitrification. *Reprod Fertil Dev.*, **22**, 214.
- Purohit GN, Meena H, Solanki K (2012).** Effects of vitrification on immature and in vitro matured, denuded and cumulus compact goat oocytes and their subsequent fertilization. *J Reprod Infertil.*, **13** (1), 53-59.
- Rall WF (1987).** Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification, *Cryobiology*, **24**, 387-402.
- Rall WF (1992).** Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim Reprod Sci.*, **28**, 237-245.
- Rall WF, Fahy GM (1985).** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, **313**, 573-575.
- Rama Raju GA, Murali Krishna K, Prakash GJ, Madan K (2006).** Vitrification: an emerging technique for cryopreservation in assisted reproduction programmes. *Embryo Talk.*, **1** (4), 210-227.
- Rao BS, Mahesh YU, Charan KV, Suman K, Sekhar N, Shivaji S (2012).** Effect of vitrification on meiotic maturation and expression of genes in immature goat cumulus oocyte complexes. *Cryobiology*, **64** (3), 176-184.
- Rayos AA, Takashashi Y, Hishinuma M, Kanagawa (1994).** Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J Reprod Fertil.*, **100**, 123-129.
- Riha J, Landa V, Kneissl J, Matus J, Jindra J, Kloucek Z (1991).** Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after nonsurgical transfer. *Zivocisna Vyroba-UVTIZ (CSFR)*, **36**, 113-120.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002).** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, **61**, 234-248.

- Roy TK, Brandi S, Tappe NM, Bradley CK, Vom E, Henderson C, Lewis C, Battista K, Hobbs B, Hobbs S, Syer J, Lanyon SR, Dopheide SM, Peura TT, McArthur SJ, Bowman MC, Stojanov T (2014).** Embryo vitrification using a novel semi-automated closed system yields in vitro outcomes equivalent to the manual Cryotop method. *Human Reproduction*, **29 (11)**, 2431-2438.
- Rybska M, Knap S, Jankowski M, Jeseta M, Bukowska D, Antosik P, Nowicki M, Zabel M, Kempisty B, Jaśkowski JM (2018).** Cytoplasmic and nuclear maturation of oocytes in mammals—living in the shadow of cells developmental capability. *Medical Journal of Cell Biology*, **6 (1)**, 13-17.
- Sağırkaya H (2001).** *Değişik gelişim dönemlerinde bulunan hibrit fare embriyolarının vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması.* Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Sağırkaya H, Bağış H (2003).** Memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu. *Uludag Univ J Fac Vet Med.*, **22 (1-2-3)**, 127-135.
- Saha S, Boediono A, Sumantri C, Murakami M (1996).** Vitrification of bovine in vitro matured and pronuclear oocytes with different vitrification solutions. *Theriogenology*, **45 (1)**, 179.
- Salzano A, Albero G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, Zicarelli L, Gasparrini B (2014).** Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Animal reproduction science*, **151 (3-4)**, 91-96.
- Sanches BV, Marinho LSR, Filho BDO, Pontes JHF, Basso AC, Meirinhos MLG, Silva-Santos KC, Ferreira CR, Seneda MM (2013).** Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, **80 (4)**, 372-377.
- Saragusty J, Arav A (2011).** Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, **14**, 1-19.
- Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L (1987).** Morphology and fertilizability of frozen human oocytes. *Gamete research*, **16**, 343-354.
- Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L, Brady T (1988).** The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod.*, **3 (8)**, 968-977.

- Saunders KM, Parks JE (1999).** Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro matured bovine oocytes. *Biol Reprod.*, **61**, 178-187.
- Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE, Eppig JJ (1990).** Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. *J Reprod Fertil.*, **89**, 43-50.
- Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981).** Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes in intact cells. *Proc Natl Acad Sci.*, **78**, 3363–3367.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO (2000).** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, **53 (1)**, 59-72.
- Sherman JK, Lin TP (1959).** Temperature shock and cold-storage of unfertilized mouse eggs. *Fertil Steril*, **10**, 384-396.
- Shim C, Lee SG, Song WK, Lee CS, Lee KK, Kim K (1997).** Laminin chain-specific gene expression during mouse oocyte maturation. *Mol Reprod Dev.*, **48 (2)**, 185-193.
- Silva CC, Knight PG (2000).** Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *J Reprod Fertil.*, **119**, 261–269.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL (1989).** Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod.*, **40**, 1257-1263.
- Sripunya N, Liang Y, Panyawai K, Srirattana K, Ngernsoungnern A, Ngernsoungnern P, Ketudat-Cairns M, Parnpai R (2014).** Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. *Cryobiology*, **69 (3)**, 496–499.
- Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, Rall WF, Pitt RE, Lin TT, MacIntyre RJ (1990).** Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, **345**, 170-172.
- Subramaniam A, Devarajan KP, Mohanan M (1990).** Incidence and avoidance of zona fracture in cryopreserved bovine ova and embryos. *New Zealand Veterinary Journal*, **38 (4)**, 156–157.

- Succu S, Leoni GG, Bebbere D, Berlinguer F, Mossa F, Bogliolo L, Madeddu M, Ledda S, Naitana S (2007).** Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, **74** (10), 1337-1344.
- Sugiyama R, Nakagawa K, Shirai A, Sugiyama R, Nishi Y, Kuribayashi Y ve Inoue M (2010).** Clinical outcomes resulting from the transfer of vitrified human embryos using a new device for cryopreservation (plastic blade). *J Assist Reprod Gene.*, **27**, 161-167.
- Sun OY, Yang OZ, Liu GY, Oin PC (1995).** Cryopreservation of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, **43** (1), 329.
- Sun X, Li Z, Yi Y, Chen J, Leno GH, Engelhardt JF (2008).** Efficient term development of vitrified ferret embryos using a novel pipette chamber technique. *Biol Reprod.*, **79**, 832-840.
- Suzuki T, Boediono A, Takagi M, Saha S, Sumantri C (1996a).** Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method in vitro. *Cryobiology*, **33**, 515-524.
- Suzuki T, Takagi M, Boediono A (1996b).** Calves born after transfer of frozen-thawed bovine immature oocytes cryopreserved in various cryoprotectants. *Theriogenology*, **45**, 361.
- Szell A, Shelton JN (1987).** Osmotic and cryoprotective effect of glycerol sucrose solution on day-3 mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, **80**, 309-316.
- Szollosi D, Calarco P, Donahue R (1972).** The nuclear envelope: its breakdown and fate in mammalian oogonia and oocytes. *Anat Rec*, 174.
- Şaylan A (2011).** Kadın gamet hücresinde optimal vitrifikasyon araştırması, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- Takahashi Y, First NL (1992).** In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, **37**, 963–978.
- Tharasanit T, Colleoni S, Galli C, Colenbrander B, Stout TAE (2009).** Protective effects of the cumulus-corona radiata complex during vitrification of horse oocytes. *Reproduction*, **137** (3), 391-401.

- Tinkanen H, Bläuer M, Laippala P, Tuohimaa P, Kujansuu E (2001).** Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, **94** (1), 109- 113.
- Toner M, Cravalho EG, Karel M, Armanti DR (1991).** Cryomicroscopic analysis of intracellular ice formation during freezing of mouse oocytes without cryoadditives. *Cryobiology*, **28**, 55-71.
- Topuzoğlu DB (2011).** Farklı büyüklükteki sığır oositlerinin maturasyon ve fertilizasyonu üzerine insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve epidermal büyüme faktörünün (EGF) etkilerinin araştırılması, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Jinekoloji (Veterinerlik) Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Trounson A, Kirby C (1989).** Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethylsulfoxide. *Fertil Steril.*, **52**, 778-786.
- Trounson A, Mohr L (1983).** Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, **305**, 707-709.
- Tsang WH, Chow KL (2009).** Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *BioTechniques*, **46**, 550-552.
- Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB (1998).** Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil Steril.*, **70** (3), 578-579.
- Turathum B, Saikhun K, Sangsuwan P, Kitiyanant Y (2010).** Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. *Reproductive biology and endocrinology*, **8** (1), 70.
- Ün M, Küplülü Ş (2005).** Mezbahadan toplanan ovaryumlardan elde edilen sığır oositlerinin in vitro maturasyonu ve fertilizasyonu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, **52**, 93-98.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth P J, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998).** Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.*, **51**, 53-58.
- Vajta G, Kuwayama M (2006).** Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, **65** (1), 236-244.

- Van Blerkom J, Davis PW (1994).** Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Microsc Res Technol.*, **27**, 165-193.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, Wisse E, Van Steirteghem A (1988).** Effect of 1, 2-propanediol and dimethyl sulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reproduction*, **3 (8)**, 960-967.
- Van Uem JF, Siebzehnruhl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N (1987).** Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet*, **1**, 752-753.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaart V, Schoysman E (2000).** In vitro survival of metaphase II oocytes (M II) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Fertil Steril.*, **74**, 215–216.
- Vieira AD, Mezzalira A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MI, Vajta G (2002).** Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, **45**, 91-94.
- Vincent C, Garnier V, Heyman Y, Renard JP (1989).** Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fertil.*, **87**, 809-820.
- Wang JH (2000).** A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation. *Cryobiology*, **41**, 1–9.
- Wang Q, Sun QY (2007).** Evaluation of oocyte quality: Morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev.*, **19 (1)**, 1-12.
- Wani NA, Misra AK, Maurya SN (2004).** Maturation rates of vitrified-thawed immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of different types of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, **84**, 327-335.
- Weikert L, Fralick C, Wiemer KE (2012).** *Essential Instruments and Disposable Supplies for an IVF Laboratory*. In: Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A (Eds), *Practical manual of in vitro fertilization: advanced methods and novel devices*. Springer Science & Business Media, p: 55-60.
- Whittingham DG (1977).** Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. *J Reprod Fertil.*, **49**, 89-94.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972).** Survival of mouse embryos frozen to -196° and -269°C. *Science*, **178**, 411-414.



- Wilmut I (1986).** *Cryopreservation of mammalian eggs and embryos*. In: Gwatkin RBL (Ed): *Developmental Biology. A Comprehensive Synthesis*. Vol. 4, *Manipulation of Mammalian Development*. New York: Plenum, pp 217-247.
- Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, Dodds KG, Walling GA, McEwan JC, O'Connell AR, McNatty KP, GW (2001).** Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod.*, **64**, 1225-1235.
- Wrenzycki C, Stinshoff H (2013).** Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reprod Dom Anim.*, **48**, 38-43.
- Wu B, Tong J, Leibo SP (1999).** Effects of cooling germinal vesicle-stage bovine oocytes on meiotic spindle formation following in vitro maturation. *Mol Reprod Dev.*, **54**, 388-395.
- Wu D, Cheung QCK, Wen L, Li J (2006).** A Growth-Maturation System That Enhances the Meiotic and Developmental Competence of Porcine Oocytes Isolated from Small Follicles. *Biol Reprod.*, **75** (4), 547-554.
- Wu G, Jia B, Quan G, Xiang D, Zhang B, Shao Q, Hong Q (2017a).** Vitrification of porcine immature oocytes: Association of equilibration manners with warming procedures, and permeating cryoprotectants effects under two temperatures. *Cryobiology*, **75**, 21-27.
- Wu H, Yu XL, Guo XF, Zhang F, Pei XZ, Li XX, Han WX, Li YH (2017b).** Effect of liquid helium vitrification on the ultrastructure and related gene expression of mature bovine oocytes after vitrifying at immature stage. *Theriogenology*, **87**, 91-99.
- Xu KP, Betteridge KJ (1992).** Cryopreservation of bovine oocytes using propylene glycol: preliminary results. *Theriogenology*, **37**, 324.
- Yadav BR, Katiyar PK, Chauhan MS, Madan ML (1997).** Chromosome configuration during in vitro maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. *Theriogenology*, **47**, 943-951.
- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PE, Presicce GA (1998).** Control of oocyte maturation in cows biological factors. *Theriogenology*, **49**, 471-82.

- Yavin S ve Arav A (2001).** Development of immature bovine oocytes vitrified by minimum drop size technique and a new vitrification apparatus (VIT-MASTER). *Cryobiology*, **43**, 331.
- Yavin S, Arav A (2007).** Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, **67**, 81-89.
- Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A (2009).** Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum Reprod.*, **24 (4)**, 797-804.
- Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SY, Ko JJ, Cha KY (2000).** Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated IVF-embryo transfer program. *Fertil Steril.*, **74**, 180-181.
- Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, Cha KY (2003).** Live birth after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization embryo-transfer program. *Fertil Steril.*, **79**, 1323-1326.
- Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA (1989).** Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.*, **23**, 189-201.
- Yu XL, Xu YK, Wu H, Guo XF, Li XX, Han WX, Li YH (2016).** Successful vitrification of bovine immature oocyte using liquid helium instead of liquid nitrogen as cryogenic liquid. *Theriogenology*, **85(6)**, 1090-1096.
- Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC (1984).** Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril.*, **42 (2)**, 293-296.
- Zhang J, Nedambale TL, Yang M, Li J (2009).** Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. *Animal reproduction science*, **110**, 46-55.
- Zhao XM, Quan GB, Zhou GB, Hou YP, Zhu SE (2007).** Conventional freezing, straw, and open-pulled straw vitrification of mouse two pronuclear (2-PN) stage embryos. *Animal biotechnology*, **18 (3)**, 203-212.
- Zhou XL, Al Naib A, Sun DW, Lonergan P (2010).** Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology*, **61**, 66-72.

## EKLER

**Ek-1:** 1ml Gentamisin içeren 1 lt'lik % 0.9'luk serum fizyolojik

1 lt'lik % 0.9'luk serum fizyolojik			
Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
Sodyum Klorür	Sigma	-	9 gr
Saf Su (Saf H <sub>2</sub> O)	-	-	1 lt
FİLTASYON (+4 °C' de süresizce saklanabilir)			
1 ml Gentamisin içeren 1 lt'lik % 0.9'luk serum fizyolojik			
Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
% 0,9' luk NaCl	-	-	1 lt
Gentamisin	İ. E. Ulugay	Genta® 80 mg	1 ml

**Ek-2:** 100 ml'lik manipülasyon medyumu

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1 lt	99 ml
CS	Sigma-Aldrich	C8056-500 ml	1 ml

**Ek-3:** 10 ml'lik OPS Vitrifikasyon Solüsyonu 1 (OVS 1)

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1 lt	6 ml
CS	Sigma-Aldrich	C8056-500 ml	2 ml
DMSO	Sigma-Aldrich	D4540-100 ml	1 ml
EG	Merck	M100949.1000	1 ml

**Ek-4:** 10 ml'lik OPS Vitrifikasyon Solüsyonu 2 (OVS 2)

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1 lt	4 ml
CS	Sigma-Aldrich	C8056-500 ml	2 ml
DMSO	Sigma-Aldrich	D4540-100 ml	2 ml
EG	Merck	M100949.1000	2 ml
Sükroz	Sigma-Aldrich	S7903-250 gr	1.7115 gr

**Ek-5:** 10 ml'lik SSV Vitrifikasyon Solüsyonu 1 (SVS 1)

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Marka</b>	<b>Ürün Kodu (Katalog No)</b>	<b>Miktar</b>
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1 lt	7.6 ml
CS	Sigma-Aldrich	C8056-500 ml	2 ml
EG	Merck	M100949.1000	400 µl

**Ek-6:** 10 ml'lik SSV Vitrifikasyon Solüsyonu 2 (SVS 2)

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Marka</b>	<b>Ürün Kodu (Katalog No)</b>	<b>Miktar</b>
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1 lt	4.5 ml
CS	Sigma-Aldrich	C8056-500 ml	2 ml
EG	Merck	M100949.1000	3.5 ml
PVP	Sigma-Aldrich	P0930-50 gr	0.5 gr
Trehaloz	Sigma-Aldrich	T0167-100 gr	1.51332 gr

**Ek-7:** 10 ml'lik OPS Çözdürme Solüsyonu 1 (OÇS 1)

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Marka</b>	<b>Ürün Kodu (Katalog No)</b>	<b>Miktar</b>
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1 lt	8 ml
CS	Sigma-Aldrich	C8056-500 ml	2 ml
Sükroz	Sigma-Aldrich	S7903-250 gr	0.85575 gr

**Ek-8:** 10 ml'lik OPS Çözdürme Solüsyonu 2 (OÇS 2)

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Marka</b>	<b>Ürün Kodu (Katalog No)</b>	<b>Miktar</b>
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1 lt	8 ml
CS	Sigma-Aldrich	C8056-500 ml	2 ml
Sükroz	Sigma-Aldrich	S7903-250 gr	0.51345 gr

**Ek-9:** 10 ml'lik SSV Çözdürme Solüsyonu 1 (SÇS 1)

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Marka</b>	<b>Ürün Kodu (Katalog No)</b>	<b>Miktar</b>
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1 lt	8 ml
CS	Sigma-Aldrich	C8056-500 ml	2 ml
Trehaloz	Sigma-Aldrich	T0167-100 gr	1.13499 gr

**Ek-10:** 10 ml'lik SSV Çözdürme Solüsyonu 2 (SÇS 2)

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Marka</b>	<b>Ürün Kodu (Katalog No)</b>	<b>Miktar</b>
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1lt	8 ml
CS	Sigma-Aldrich	C8056-500 ml	2 ml

**Ek-11:** 10 ml'lik IVM medyumu

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Marka</b>	<b>Ürün Kodu (Katalog No)</b>	<b>Miktar</b>
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1 lt	8.74975 ml
FCS	Sigma-Aldrich	F7305-100 ml	1 ml
Antibiyotik	Sigma-Aldrich	A5955-20 ml	100 µl
LH	Merck Serono	Ovitrelle 250 µg / 0.5 ml	100 µl
FSH stok	-	-	1 µl
Na-piruvat stok	-	-	50 µl

**Ek-12:** FSH stok

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Marka</b>	<b>Ürün Kodu (Katalog No)</b>	<b>Miktar</b>
FSH	Bioniche Animal Health	Folltropin	1 flakon
Saf Su	-	-	80 ml

**Ek-13:** Na-piruvat Stok

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Marka</b>	<b>Ürün Kodu (Katalog No)</b>	<b>Miktar</b>
TCM199 medyumu	Sigma-Aldrich	M2520-10x1 lt	10 ml
Na-piruvat	Sigma-Aldrich	P4562-5 gr	0.055 gr

**Ek-14:** Laboratuvar Kayıt Formu

**BURDUR MAKÜ REPRODUKTİF BİYOTEKNOLOJİ  
LABORATUVARLARI**

**LABORATUVAR KAYIT FORMU**

**01. Genel bilgiler:**

02. Toplanan materyal protokol numarası:

03. Materyalin alındığı tarih ve saat:

04. Materyalin laboratuvara getirildiği saat:

05. Materyali alan görevli ve imzası:

06. Materyalin alındığı mezbahane:

07. Kesilen hayvan sayısı:

08. Ovaryumların laboratuvara getirilmesi:

( ) Uygun şartlarda; ( ) Uygun olmayan şartlarda

09. Diğer ek bilgiler:

**10. İn vitro oosit eldesi :**

11. Yöntem:

( ) Oosit aspirasyonu; ( ) Ovaryum dilimleme; ( ) Follikül diseksiyonu

12. Elde edilen ovaryum sayısı : ( ) adet elde edildi.

13. Ovaryum üzerindeki follikül sayısı: ( ) adet; ( ) adet aspire edildi.

14. Elde edilen oosit sayısı:

( ) adet kaliteli + ( ) adet kalitesiz = toplam ( ) adet oosit elde edildi.

15. Diğer ek bilgiler:

**16. Oosit Dondurma:**

17. Dondurma yöntemleri:

( ) Yavaş dondurma; ( ) Vitrifikasyon; ( ) diğer → .....

18. Vitrifikasyon yöntemleri:

( ) OPS; ( ) SSV; ( ) diğer → .....

19. Dondurulan oosit sayısı:

( ) adet OPS ; ( ) adet SSV; ( ) diğer → .....

20. Oositlerin dondurulduğu tarih ve saat:

21. Diğer ek bilgiler:

**22. Oositlerin dondurularak saklanması:**

23. Oositlerin sıvı azot tankı içinde saklandığı yer:

- OPS yöntemiyle dondurulan ( ) adet oosit ( ) numaralı kalisterde (alttaki / üstteki) büyük goblet içinde ( ) tarihli küçük gobletler içinde OPS payetlerinde saklanmaktadır.

- SSV yöntemiyle dondurulan ( ) adet oosit ( ) numaralı kalisterde alttaki büyük goblet içinde ( ) numaralı cryostore cane üzerinde alttan ( ) gözde bulunan ( ) tarihli godeler içinde saklanmaktadır.

24. Oositler en az ( ) tarihin kadar sıvı azot içinde saklanacaktır.

**25. Oositlerin Çözdürülmesi:**

26. Çözdürme yöntemleri:

( ) Yavaş dondurma; ( ) Vitrifikasyon; ( ) diğer → .....

27. Vitrifikasyon sonrası çözdürme yöntemleri:

( ) OPS; ( ) SSV; ( ) diğer → .....

28. Çözdürülen oosit sayısı:

( ) adet OPS; ( ) adet SSV; ( ) diğer → .....

29. Oositlerin çözdürüldüğü tarih ve saat :

( ) OPS; ( ) SSV

30. Dondurulup çözdürülen oositlerin bulguları ve başarı oranları:

-OPS yönteminde ( ) adet oosit sağlıklı; ( ) adet oosit dejenere oldu.

-SSV yönteminde ( ) adet oosit sağlıklı; ( ) adet oosit dejenere oldu.

31. Diğer ek bilgiler :

**32. İn vitro maturasyon :**

33. Yöntem: ( ) standart IVM prosedürü ( ) diğer → .....

34. IVM uygulanan oosit sayısı: OPS işleminden sonra ( ) adet + SSV işleminden sonra ( ) adet + Vitrikiye edilmeksizin kontrol grubunda ( ) adet = Toplam ( ) adet oosite IVM işlemi uygulandı.

35. Oositlerin IVM medyumuna tabi kaldığı süre: ( ) saattir.

36. Maturasyon bulguları:

- OPS sonrası IVM' e tabi tutulan

( ) adet oosit kumulüs ekspansiyonu açısından değerlendirildi.



( ) adet oosit 0 Derece, ( ) adet oosit 1 Derece, ( ) adet oosit 2 Derecede kumulüs ekspansiyonu görüldü.

( ) adet oosit kumulüs hücrelerinden soyulması için vortekslendi.

( ) adet oosit vorteks esnasında kaybedildi ve vorteks sonrasında ( ) adet oosit elde edildi.

( ) adet oositin perivitellin boşluğuna polar body atıldı.

( ) adet oositin perivitellin boşluğuna polar body atılmadı.

- SSV sonrası IVM' e tabi tutulan

( ) adet oosit kumulüs ekspansiyonu açısından değerlendirildi.

( ) adet oosit 0 Derece, ( ) adet oosit 1 Derece, ( ) adet oosit 2 Derecede kumulüs ekspansiyonu görüldü.

( ) adet oosit kumulüs hücrelerinden soyulması için vortekslendi.

( ) adet oosit vorteks esnasında kaybedildi ve vorteks sonrasında ( ) adet oosit elde edildi.

( ) adet oositin perivitellin boşluğuna polar body atıldı.

( ) adet oositin perivitellin boşluğuna polar body atılmadı.

- Vitrikiye edilmeksizin kontrol grubunda IVM' e tabi tutulan

( ) adet oosit kumulüs ekspansiyonu açısından değerlendirildi.

( ) adet oosit 0 Derece, ( ) adet oosit 1 Derece, ( ) adet oosit 2 Derecede kumulüs ekspansiyonu görüldü.

( ) adet oosit kumulüs hücrelerinden soyulması için vortekslendi.

( ) adet oosit vorteks esnasında kaybedildi ve vorteks sonrasında ( ) adet oosit elde edildi.

( ) adet oositin perivitellin boşluğuna polar body atıldı.

( ) adet oositin perivitellin boşluğuna polar body atılmadı.

37. IVM başarı oranı:

- OPS sonrası IVM' e tabi tutulan

( ) adet oositin maturasyonu sağlandı.

(% ) oranında IVM başarı oranı elde edildi.

- SSV sonrası IVM' e tabi tutulan

( ) adet oositin maturasyonu sağlandı.

(% ) oranında IVM başarı oranı elde edildi.

- Vitrikiye edilmeksizin kontrol grubunda IVM' e tabi tutulan

( ) adet oositin maturasyonu sağlandı.

(% ) oranında IVM başarı oranı elde edildi.

38. Diğer ek bilgiler:

**39. SONUÇ:**

**40. İMZALAR:**

Uygulamayı Yapan

Kontrol Eden

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Şöhret GÜLER  
**Doğum Yeri ve Yılı** : Dinar 24.08.1989  
**Medeni Hali** : Bekar  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**Uyruğu** : Türkiye Cumhuriyeti  
**Telefon No** : 05067833635  
**Elektronik Posta** : [sohretguler89@gmail.com](mailto:sohretguler89@gmail.com)  
**İletişim Adresi** : Şirinevler Mahallesi  
39018. Sokak No:9 D:7  
Merkez/BURDUR



### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

**Ön Lisans:** Selçuk Üniversitesi, Karapınar Aydoğan Meslek Yüksekokulu, Hayvan Yetiştiriciliği ve Sağlığı, 2008.

**Lisans:** Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 2012.

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

1. 2014 yılı Temmuz ayında Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezinde yapılan çalışmalara 14 gün boyunca katılım sağladım.
2. 2015-2016 yılları arasında “Kedilerde Gebelik Sürecinde İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) Ailesinin Uterusta Gen ve Protein Düzeyinde Araştırılması” isimli Tübitak Projesinde bursiyer öğrencisi olarak çalıştım.
3. 30.10.17-03.11.17 tarihleri arasında TÜBİTAK MAM’da verilen ‘Farelerde Embriyo Manipülasyonları, Transgenik Fare Üretimi ve Sistem Biyolojisi’ konulu eğitim program sonucu katılım belgesi aldım.

4. 2017-2018 yılları arasında “Preterm Doğum Öncesi Maternal Magnezyum Sülfat Tedavisinin Endotoksin ile İndüklenmiş Fetal Beyin Hasarını Önlemede Beynin Farklı Bölgelerindeki Gebe Keçi Modelinde Araştırılması” isimli Tübitak Projesinde bursiyer öğrencisi olarak çalıştım.

**Yayımları (SCI ve diğer makaleler):**

1. TVJD VII. Ulusal & I. Uluslar arası Kongresi’ne katılım belgesi (12-15 Ekim 2017-Marmaris) (“Sığır Oositlerinin Kriyoprezervasyonunda Güncel Yaklaşımlar” başlıklı poster sunumu sunuldu.)