



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DÖLERME VE SUN'I TOHURLAMA ANABİLİM DALI

108167

DEĞİŞİK GELİŞİM DÖNEMLERİNDE BULUNAN HİBRİT FARE  
EMBRİYOLARININ VİTRİFİKASYON YÖNTEMİYLE DONDURULMASI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Hakan SAĞIRKAYA

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2001



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DÖLERME VE SUN'İ TOHURLAMA ANABİLİM DALI**

**DEĞİŞİK GELİŞİM DÖNEMLERİNDE BULUNAN HİBRİT FARE  
EMBRYOLARININ VİTRİFİKASYON YÖNTEMİYLE DONDURULMASI**

**Hakan SAĞIRKAYA**

**(DOKTORA TEZİ)**

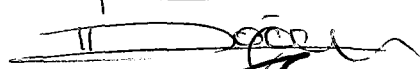
**Danışman: Yard. Doç. Dr. İbrahim DOĞAN**

**İkinci Danışman: Dr. Haydar BAĞIŞ**

**Bursa-2001**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu tez, jürimiz tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanları	Yard. Doç. Dr. İbrahim DOĞAN Dr. Haydar BAĞIŞ	 
Üye	Prof. Dr. M. Kemal SOYLU	
Üye	Doç. Dr. Serhat PABUÇÇUOĞLU	
Üye	Doç. Dr. Sema BİRLER	
Üye	Doç. Dr. Ayşin ŞEN	

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun .....27.04.2001..... tarih,  
..2001/11..... sayılı toplantısında alınan ....04..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Recep Tınar  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	IV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	5
Embriyoların dondurularak saklanması avantajları.....	5
Dondurmada kullanılan kriyoprotektan maddeler ve solüsyonlar.....	7
Embriyoların dondurulmasında kullanılan yöntemler.....	9
Geleneksel yavaş dondurma (slow freezing).....	9
Vitrifikasyon.....	10
Hızlı dondurma (rapid freezing).....	14
Embriyoların çözündürülmesi.....	15
Kriyoprotektanların uzaklaştırılması.....	15
Embriyo dondurma ve çözündürme işlemlerinde başarı oranını etkileyen faktörler.....	16
Oositlerin dondurulması.....	17
GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
Çalışmada kullanılan hibrit fareler.....	18
Süperovulasyon.....	18
Embriyo toplama pipetlerinin hazırlanması.....	18
Embriyoların yıkanmasında ve kültüründe kullanılan vasatlar.....	19
Embriyo kültür kaplarının hazırlanması.....	19
Embriyoların elde edilmesi.....	21
Vitrifikasyon işleminde ve çözündürme sonrası kriyoprotektanların uzaklaştırılmasında kullanılan vasatlar.....	22
Embriyoların vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması.....	24
Embriyoların çözündürülmesi.....	27
Çözündürme sonrası embriyoların kültür edilmesi ve değerlendirilmesi.....	27
Dondurma solüsyonları için toksisite testleri.....	28
Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi.....	28
BULGULAR.....	29
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	34
EKLER.....	46
KAYNAKLAR.....	47
TEŞEKKÜR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	56

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı, morula ve blastosist aşamasındaki fare embriyolarının vitrifikasyonla dondurulmasında vitrifikasyon solüsyonu 3 (VS3) ve etilen glikol (EG) vitrifikasyon solüsyonlarının etkinliğini karşılaştırmaktır.

Embriyolar ya 10 dakika süreyle 1.625 M gliserol + %1.5 polietilen glikol (PEG) içeren %25 VS3 içerisinde ya da 2 dakika süreyle 2 M etilen glikol (EG) + %10 fetal buzağı serumu (FCS) içerisinde oda ısısında ekilibre edilmiştir. Vitrifikasyon için M2 vasatı içerisinde hazırlanmış %100 VS3 (6.5 M gliserol + %6 PEG) veya 7 M EG solüsyonları kullanılmıştır. %25 VS3 içerisinde ekilibre edilen embriyolar %100 VS3 içerisine transfer edilmiş ve orada 30 saniye süre ile bekletilmiştir. Daha sonra, embriyolar 0.25 ml'lik payetler içerisine aktarılmıştır. Payetler yaklaşık 1 dakika süreyle sıvı azot buharında bekletilmiş ve sonrasında zaman geçirmeden sıvı azot içerisine daldırılmıştır. İki M EG + %10 FCS içerisinde ekilibre edilen embriyolar 7 M EG içerisine transfer edilmiş ve orada 2 dakika süre ile bekletilmiştir. Daha sonra, embriyolar 0.25 ml'lik payetler içerisine aktarılmış ve payetler yaklaşık 1 dakika sıvı azot buharında bekletildikten sonra sıvı azot içerisine daldırılmıştır.

Her iki gruptaki embriyolar 25°C'deki sıcak su banyosunda 20 saniye bekletilerek çözüldürülmüş ve M2 içerisinde hazırlanan 1 M'lık sükröz solüsyonu içerisine aktarılarak 5 dakika süreyle bekletilmiştir. Daha sonra embriyolar 24-48 saat süreyle yüksek nemli, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C'lik etüv şartlarında CZB kültür vasatı içerisinde kültüre edilmiştir. VS3 ve EG içerisinde vitrifiye edilen moruların gelişim oranları (sırasıyla %71.42 ve %28.97), VS3 ve EG içerisinde vitrifiye edilen blastosistlerin gelişim oranlarından (sırasıyla %4.76 ve %3.12) daha yüksek bulunmuştur.

VS3 ve EG içerisinde vitrifiye edilen morula dönemindeki embriyoların gelişim oranları arasındaki fark önemli bulunmuştur (sırasıyla 80/112, %71.42 ve 31/107, %28.97; P<0.001). Bununla birlikte, VS3 ve EG içerisinde vitrifiye edilen blastosist dönemindeki embriyoların gelişim oranları arasında önemli bir fark bulunmamıştır (sırasıyla 5/105, %4.76 ve 3/96, %3.12; P>0.05).

Sonuç olarak, iki embriyonik gelişim dönemi açısından, morula dönemindeki embriyoların vitrifikasyon işlemine blastosist dönemindeki embriyolara oranla daha iyi dayandığı ve morula dönemindeki embriyoların vitrifikasyon işlemi için VS3 vitrifikasyon yönteminin EG vitrifikasyon yönteminden daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır. Bu

sonuçlara göre, fare embriolarının başarılı kriyoprezervasyonu için morula dönemindeki embrioların VS3 vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Vitrifikasyon, fare, morula, blastosist, VS3, EG



## SUMMARY

### **Cryopreservation of hybrid mouse embryos at different developmental stages by vitrification method**

The purpose of this study was to compare the efficiency of two media, VS3 (vitrification solution 3) and EG (ethylene glycol) vitrification media) on the vitrification of morula and blastocyst stage mouse embryos.

Embryos were equilibrated either for 10 minutes in 25% VS3 containing 1.625 M glycerol + 1.5% polyethylene glycol (PEG) or for 2 minutes in 2 M ethylene glycol, EG + 10% fetal calf serum, FCS at room temperature. For vitrification either 100% VS3 (6.5 M glycerol + 6% PEG) or 7 M EG in M2 was used. Embryos equilibrated in 25% VS3 were transferred into 100% VS3 and held there for 30 seconds. Then, they were loaded into 0.25 ml straws. After that, straws were held in liquid nitrogen vapor for approximately 1 minute and then immediately plunged into liquid nitrogen. Embryos equilibrated in 2 M EG + 10% FCS were transferred into 7 M EG and held there for 2 minutes. After this, they were loaded into 0.25 ml straws. Then, straws were held in liquid nitrogen vapor for about 1 minute and then immediately plunged into liquid nitrogen.

Embryos from both groups were thawed in a 20°C water bath for 20 seconds, transferred to 1 M sucrose in M2 for 5 minutes and then cultured for 24 to 48 hours in CZB medium at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in highly humidified air. Survival rates of morula stage embryos vitrified in both VS3 (71.42%) and EG (28.97%) was found higher than those of blastocyst stage embryos vitrified in both VS3 (4.76%) and EG (3.12%).

There was a significant difference between the survival rates of morula stage embryos vitrified in VS3 and EG (80/112, 71.42% and 31/107, 28.97%, respectively;  $P < 0.001$ ). However, no difference was found between the survival rates of blastocyst stage embryos vitrified in VS3 and EG (5/105, 4.76% and 3/96, 3.12%, respectively;  $P > 0.05$ ).

As a result, it was concluded that, of the 2 developmental stages, morula withstand the vitrification better, and vitrification using VS3 procedure was found more superior than vitrification using EG in terms of morula vitrification. According to these results, vitrification of morula stage mouse embryos with VS3 vitrification procedure could be suggested for successful cryopreservation of mouse embryos.

Key Words: Vitrification, mouse, morula, blastocyst, VS3, EG

## GİRİŞ

Biyolojik bilimler alanındaki bilimsel gelişmeler 20. yüzyılın sonlarında hız kazanmış ve büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu alanlar içerisinde biyoteknolojinin yeri ayrı bir öneme sahiptir. Özellikle, Reprodüktif Biyoteknoloji alanındaki gelişmelerle hayvansal üretimin iyileştirilmesi yolunda büyük yol kat edilmiştir. Dünyada bu alanda uygulanan ilk yöntem olan sun'i tohumlama uygulamasına ikinci başlayan ülke olmamıza karşın, kat edilen yol günümüzde istenilen düzeyin çok gerisinde kalmıştır (1). Bunu hayvan sayımızla hayvansal üretimimizi karşılaştırarak en iyi biçimde anlayabiliriz. Ülkemizde biyoteknoloji kavramı özellikle son yıllarda ciddi bir biçimde ele alınmaya başlanmış olup, belirli kurumlarda gecikmeli de olsa, uygulamaya yönelik bazı çalışmalar sürdürülmektedir. İşte, bu sebeplerden ötürü, hem bilimsel hem de hayvancılığın ıslah edilmesiyle ilgili çalışmalarda büyük önem taşıyan embriyo dondurma teknolojisi ile ilgili bir çalışma yapılmasının ülkemiz açısından faydalı olabileceği kanısına varılmıştır.

Embriyoların dondurulmasının bir çok avantajı bulunmaktadır. Dondurulan embriyolarla kurulacak bir embriyo bankası ünitesiyle, ülkemiz yerli hayvan varlığının korunması sağlanarak, bu hayvanların genlerinden gelecekte gelişen teknolojilerle yararlanma şansı ortaya çıkacaktır. Ayrıca, üstün niteliklere sahip hayvanlardan elde edilecek embriyoların farklı bölgelere kolayca transfer edilmeleri de mümkün olabilecektir. Böylelikle, ülkemiz hayvancılığının geliştirilmesine önemli katkılar sağlanabilecektir.

Memeli embriyolarının dondurularak saklanabilmesiyle, farklı türlerin genomlarının tüm özellikleri uzun bir zaman saklanabilir duruma gelmiştir. Bu nedenle bir embriyonun dondurulması, spermanın ya da oositin tek başına dondurulmasıyla karşılaştırıldığında daha avantajlı bir durum sergilemektedir. Bunun yanı sıra, embriyoların dondurularak saklanmalarıyla, üstün genetik niteliklere sahip olan hayvanların genetik özelliklerinin tüm dünyaya yayılması daha da kolaylaşmış ve bu şekilde hayvan yetiştiriciliği programlarında, hayvansal üretimde, beşeri açıdan yardımcı üreme tekniklerinde, gen mühendisliği ve biyomedikal çalışmalarda ve özellikle de nesli tükenmekte olan türlerin korunmasında büyük ilerlemeler sağlanmıştır.

Günümüzde embriyo transfer uygulamalarında embriyoların dondurulması bir çok evcil ve laboratuvar hayvan türünde rutin olarak uygulanır hale gelmiştir (2-9). Ancak, günümüze değin ülkemizde embriyoların dondurulmasına ilişkin herhangi bir çalışma henüz yapılmamıştır.



Canlı hücrelerin dondurularak sınırsız süre saklanabilmesi ve gerekli durumlarda bunların çözündürülerek kullanılabilmesi bilim adamlarını cezbeden en önemli konulardan biri olmuştur. Gliserolün 1949 yılında sperm hücrelerinin dondurulmasında kullanılmasıyla başlayan dondurarak saklamadaki başarı (10), embriyoların da dondurularak saklanması için gerekli araştırmaların yapılmasının önünü açmıştır. Dondurulan spermanın ya da embriyoların herhangi bir zarara uğramadan sınırsız süreyle saklanabileceği bildirilmektedir (11).

Bilindiği üzere, fare bilimsel çalışmalarda insan ve diğer hayvan türleri için en önemli modellerden birisini oluşturmaktadır. İnsan embriyo ve oositlerinin dondurularak saklanması için yapılacak denemelerde de fareler model olarak kullanılmaktadır (12, 13). Fare embriyoları ilk defa 1972 yılında Whittingham ve arkadaşları (14) tarafından dondurulmuştur. Bir sonraki yıl içerisinde ise, Wilmot ve Rawson (15) tarafından dondurulmuş bir sığır embriyosundan buzağı elde edildiği bildirilmiştir.

Dünyada farklı dondurma solüsyonlarının ve yavaş ya da hızlı soğutma ve ısıtma oranlarının uygulandığı çeşitli yöntemler yaygın biçimde kullanılmaktadır (3, 16-19). Aslında uygulanmakta olan tüm yöntemlerin temel amacı, dondurma süresi boyunca hücre içinde şekillenen hücre içi buz kristallerinin oluşumunun ve çözündürme süresince şekillenecek yeniden kristalleşmenin önlenmesidir. Hücre içi buz kristallerinin şekillenmesinin önlenmesi için, hücre içi sıvının kriyoprotektan maddelerle yer değiştirmesi yani embriyoların dehidre olması sağlanır. Dondurma-çözündürme sonu canlılık oranları türler arasında bazı farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin, domuz embriyoları dondurma işlemine karşı daha duyarlıdır. Buna sebep olarak da, domuz embriyolarının yüksek oranda yağa sahip olmaları gösterilmektedir. Ayrıca, embriyonun yağ içeriğinin dışında dondurma ve çözündürme oranları, embriyoların büyüklükleri ve gelişim dönemlerinin yanı sıra, hücrelerin geçirgenlik özellikleri ve kriyoprotektanların ozmotik özellikleri ile toksisiteleri de embriyoların dondurma-çözündürme sonrası canlılık oranlarında rol oynayan temel faktörlerdir (3, 11, 19-23). Bunların dışında, farelerde ve domuzlarda yapılan çalışmalarda, genotipin de dondurma işlemine karşı gelişen duyarlılığa etki eden faktör olup olmadığı incelenmiştir (7, 20).

Embriyoların dondurulmasında başlangıçta yavaş ya da kademeli bir soğutmayı gerektiren yavaş dondurma (slow freezing) yöntemi kullanılmıştır (24-27). Geleneksel bir yöntem olan yavaş dondurmada, embriyoların dondurulması için çok pahalı ve komplike cihazlar gerekmektedir ve genellikle dondurulmuş embriyoların hayvanlara

transferlerinden önce, kullanılan kriyoprotektan solüsyonların uzaklaştırılması için yoğunlukları kademeli olarak azalan solüsyonlardan geçirilmeleri gereklidir (3, 16, 20, 23). Son 10-20 yıllık süreç içerisinde ise, dondurma ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok sistemi kolaylaştırmaya yönelik olmuştur. Örneğin, tek aşamalı biçimde kriyoprotektan solüsyonun uzaklaştırıldığı veya hiçbir işlem uygulanmadan direkt transfere olanak sağlayan yöntemler geliştirilmiştir (3, 9, 28,29). İşlemlerin bu şekilde kolaylaştırılmasıyla, donmuş embriyolardan saha şartlarında yararlanma olanaklarının artırılması amaçlanmaktadır.

İşlemlerin kolaylaştırılması için yapılmış çalışmaların sonucunda, 1985 yılında, vitrifikasyon denilen embriyo dondurma sistemi geliştirilmiştir (30). Böylece, yavaş dondurma yönteminde gerekli olan pahalı ve komplike cihazlara olan gereksinim ortadan kalkmıştır. Günümüzde, embriyoların ve oositlerin dondurulmasında vitrifikasyon yöntemi yaygın biçimde kullanılmaktadır (2, 3, 8, 16, 18, 20, 22, 31-34). Vitrifikasyonda, buz kristallerinin hiç şekillenmediği vitroz ya da camı bir durum yaratılarak, hücrelerin, dokuların ve organların direkt olarak sıvı azot içerisine daldırılmasıyla dondurulmaları sağlanmaktadır. Vitrifikasyon işleminde kriyoprotektan maddelerin soğutma işlemi boyunca buz oluşumunu önleyebilme yeteneği kritik bir unsurdur. Isı derecesi düşürüldükçe solüsyon bütün olarak oldukça viskoz bir hal alır ve sonunda tümüyle viskoz, camı bir faza geçer. Çeşitli kimyasalların sulu çözeltilerinin camı yapı şekillendirme özelliklerinin önemli derecede değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Bunun da, her bir kimyasalın vitrifikasyonu kolaylaştırma ya da donmaya karşı eğilimin azalmasında suyla olan etkileşimlerindeki farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu farklılıklar oldukça ilginç olmaktadır; şöyle ki, farklılıklar sadece farklı kriyoprotektanlar arasında değil, aynı kriyoprotektanların farklı izomerlerinde de gözlenmektedir (3). Son yıllarda, embriyoların dondurulma işleminde vitrifikasyon yöntemi oldukça yaygın biçimde kullanılmaya başlamıştır.

Dondurma ve çözündürme işlemlerinde hücrelerin zarar görmesini önlemek amacıyla, dondurma ve çözündürme solüsyonları içerisine kriyoprotektan diye adlandırılan çeşitli maddeler katılmaktadır. Bu maddeleri başlıca iki gruba ayırabiliriz:

- I) Hücre içerisine nüfuz edebilen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar. Örneğin; metanol, etilen glikol, dimetilsülfoksit ( $Me_2SO$ , DMSO), 1.2 propanediol, 2.3 bütanediol, propilen glikol, gliserol ve diğer bazı alkoller;
- II) Hücre içerisine nüfuz edemeyen kriyoprotektanlar. Bunları da kendi içerisinde iki gruba bölebiliriz:

- A) Düşük molekül ağırlıklı olanlar. Örneğin, galaktoz, glikoz, sükroz, trehaloz, ve diğer şekerler,
- B) Yüksek molekül ağırlıklı olanlar. Örneğin, polivinilpirrolidon (PVP), polivinil alkol (PVA), hidroksietil nişasta, sodyum hyaluronat ve diğer bazı polimerler (3, 11).

Son yıllarda yine oositlerin dondurularak saklanmasına ilişkin yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Oositlerin dondurulması hem yardımcı üreme teknikleri açısından hem de özellikle beşeri sahadaki uygulamalar açısından büyük önem taşımaktadır (35).

Yukarıda da değinildiği gibi henüz embriyoların dondurulmasına ilişkin çalışmalara bile tam anlamıyla başlanmamış olan ülkemizde, oositlerin dondurulmasına ilişkin çalışmalar da yapılmış değildir. Yapılan çalışma ile, Türkiye’de ilk kez embriyoların dondurulmasına ilişkin bir uygulama gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın temel konusunu farklı gelişim dönemlerindeki hibrit fare embriyolarının iki farklı dondurma solüsyonunda dondurulması ve bunların çözündürme sonrası gelişim oranlarının karşılaştırılması oluşturmaktadır. Ayrıca, çalışma, gerçekleştirildiği laboratuarda yetiştirilmekte olan farelerden elde edilecek embriyoların dondurularak saklanması ve çeşitli araştırmalar için sistemin oturtulmuş olması açısından da ayrı bir önem taşımaktadır. Çalışma ile bilimsel araştırmalarda ve üretime yönelik uygulamalarda gelişmiş ülkelerde yaygın biçimde kullanılmakta olan embriyo dondurma işleminin ülkemizde de kullanılması yolunda gerekli olan uygulamaların alt yapısı oluşturulmuştur. Ayrıca, yapılacak ek çalışmalar sonunda elde edilecek bulguların ışığı altında ülkemizdeki yerli ırktan hayvanların embriyolarının dondurularak saklanması sağlanabilecek ve bu şekilde oluşturulacak bir embriyo bankası da ülkemize kazandırılabilir.

Çalışmada, hibrit farelerden elde edilen morula ve blastosist aşamasındaki embriyoların VS3 ve EG solüsyonlarında vitrifikasyon tekniği ile dondurma ve çözündürme sonrasındaki gelişim oranlarını karşılaştırarak, hangi dönemdeki embriyoların hangi solüsyonla dondurulmasının uygun olacağını tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmadan beklenen yararlar ise, embriyoların dondurularak saklanmaları ile ilgili yöntemlerin protokollere dönüştürülüp, bu gibi çalışma yapacak olan tüm araştırmacıların kullanımına sunulması ve diğer hayvanlarda uygulanabilir bir şekilde dönüşmesinin gerçekleştirilmesidir. Böylelikle, embriyo dondurma tekniğinin ülkemize kazandırılması ve bu konuda bilimsel çalışmaların başlatılması da sağlanacaktır.

## GENEL BİLGİLER

Spermanın dondurularak saklanması gliserolün başarıyla kullanılmasının ardından (10), günümüze değin bir çok evcil ve yabani hayvan türünün embriyoları da başarılı bir şekilde dondurulmuştur. İlk başarılı embriyo dondurma işlemi, 1972 yılında, Whittingham ve arkadaşları (14) tarafından fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir. Bir yıl sonrasında ise, Wilmut ve Rowson (15) dondurulup-çözündürülmüş sığır embriyolarından elde ettikleri gebeliği bildirmiştir. Bu çalışmalarda DMSO kriyoprotektan olarak kullanılmış ve 0.2°C/dakika oranında bir soğutma oranı uygulanmıştır. Bunların dışında koyun, keçi, at, domuz, tavşan, kedi, boğa antilobu, köpek maymunu, ipek maymunu, rat, maymun ve insan embriyoları da sonraki yıllarda başarılı şekilde dondurulmuştur (2-9, 36). Günümüzde uygulanan dondurma yöntemlerinde, çeşitli kriyoprotektanlar ile yavaş veya hızlı soğutma ve ısıtma oranları kullanılmaktadır. Uygulanmakta olan tüm dondurma yöntemlerindeki temel prensip, dondurma ve çözündürme sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek, hücrelerin buz kristallerinden görecekle zararını önlemektir. Bunu sağlamak için, hücre içi sıvının, hücre membranından geçebilen, başka bir deyişle nüfuz edebilen, ve hücrelere olabildiğince zararsız olan kriyoprotektan maddelerle yer değiştirmesi amaçlanmaktadır.

### Embriyoların Dondurularak Saklanması Avantajları

Yukarıda da kısaca açıklandığı gibi embriyoların dondurularak saklanabilmesi bilimsel alanda olduğu kadar, hayvancılık ve beşeri sahada da önemli gelişmelere öncülük etmiştir. Özellikle, sığırcılık alanında günümüzde dondurulmuş embriyo satan ticari firmalar mevcuttur. Bilindiği üzere dondurulmuş sperma ile sadece babadan gelecek genetik yapıdan yararlanılabilirken, embriyo ile seçilmiş anne ve babadan gelen genler kombine edilerek bunlardan direkt olarak yararlanılabilir. Embriyo transfer teknolojisi sun'i tohumlama uygulamasından sonra, hayvan ıslahında büyük gelişmelere öncülük etmiştir. Ancak, yapılan ilk çalışmalarda taze embriyolar transfer edilmiştir. Bu sebepten, uygulamada saha şartlarında büyük problemlerle karşılaşmıştır. Ancak, embriyoların başarılı biçimde dondurulabilmesiyle, embriyo transfer uygulaması, ticari boyutta uygulanır hale gelmiştir. Taze embriyo transferlerindeki en büyük sorunlardan biri, transferlerin yapılacağı taşıyıcı hayvanların önceden senkronize edilmesini gerektirmesidir.

Ayrıca, tek bir embriyo transferi için, en az iki taşıyıcının senkronize edilerek transfere uygun olan taşıyıcının garanti edilmesi, maliyeti artıran diğer kısıtlayıcı bir unsurdur. Bunun yanı sıra, tek bir verici inekten elde edilebilecek embriyo sayısı da 2-20 arasında değişiklik göstermektedir (37-39). Bu da hazırlanacak taşıyıcı sayısının dengelenmesinde sorun çıkarmaktadır. Bütün bu sebeplerden dolayı, çiftlik hayvanlarında uygulanan taze Embriyo Transfer çalışmaları oldukça pahalı olmaktadır. Embriyoların dondurulması ile, senkronizasyona gerek kalmadan, taşıyıcıların transfere uygun zamanlarında transfer işlemi gerçekleştirilebildiğinden, bu tür ekstra maliyetler ortadan kalkmıştır. Ayrıca, dondurulmuş embriyolar kolaylıkla istenilen her bölgeye ulaştırılabilmektedir. Böylece, canlı hayvan dışsıtım ve dışalımındaki bazı zorluklar da kolaylıkla aşılabilmektedir.

Ülkemiz doğal zenginlikleri arasında sayılabilecek yerli hayvan varlığımız gün geçtikçe yok olmaktadır. Bunların çoğu verimleri düşük olsa da, ülkemiz şartlarına adapte olmuş ve bölgesel bazı hastalıklara direnç kazanmış genlere sahiptirler. İşte bu yok olan yerli hayvanlarımızın en azından embriyolarının dondurulması ile oluşturulacak bir embriyo bankasıyla, bunların genetik özelliklerinden sonraki yıllarda yararlanma şansına sahip olunabilecektir. Beşeri alanda ise, özellikle infertilite probleminden dolayı, *in vitro* fertilizasyon (IVF) uygulanan hastalardan elde edilen embriyoların sayısı istenilenden fazla olduğu takdirde dondurularak saklanmakta, böylece transfer edilen embriyolardan gebelik elde edilemediği durumlarda ya da ikinci bir çocuğun istendiği durumlarda, oldukça masraflı ve hastayı psikolojik açıdan da zorlayan uygulamalara gerek kalmadan dondurulmuş embriyolar transfer için kullanılabilir (36, 40, 41).

Sunulan çalışmanın konusunu oluşturan fare embriyolarının dondurulmasındaki avantajlar yukarıda belirtilen avantajlardan başka avantajlara da sahiptir. Bunlar özetlenecek olursa: Özellikle, değerli transgenik farelerin hastalıklardan, yangın ya da diğer kazalardan dolayı yok olmamaları, yedekte dondurulup saklanmış embriyolarla garanti altına alınmış olur. Bir çok değişik fare hatları belirli dönemlerde araştırmada kullanılırlar ve daha sonra olası durumlar için ünitede sürekli üretilerek ekstra yer, emek ve parayı gerektirirler. Böylesi ırktan fare embriyoları dondurularak saklanırsa, gerekli durumlarda taşıyıcılara transfer edilerek ünitenin ekstra yer, emek ve para külfeti azaltılabilir. Dünyaca ünlü Jackson laboratuvarında 272 fare hattının bu şekilde korunduğu bildirilmiştir (42). Sürekli üretimde farelerde bazı mutasyonların ortaya çıkması olasıdır ve dondurulan embriyolar bu türden bir bozukluğun ortaya çıkmasını önler. Spesifik patojenlerden yoksun farelerin yetiştirildiği ünitelere dışarıdan canlı hayvan sokulması tehlike arz edeceğinden, dondurulmuş embriyoların kullanılması bu tehlikeyi ortadan

kaldıracaktır. Hastalığa maruz kalmış fare hatlarının yeniden üretilmesi için en ideal yol, önceden dondurulmuş embriyoların spesifik mikroorganizmalardan yoksun taşıyıcı annelere transfer edilmesidir. Ayrıca, ithalat sırasında hayvanın maruz kalacağı stres ve karantina gibi bazı zorluklar da dondurulan embriyolarla ortadan kaldırılmış olur.

Bunların dışında embriyoların dondurulması bazı biyoteknolojik yöntemlerin uygulanabilmesi açısından da büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Özellikle, transgen teknolojisinde en yaygın uygulama alanı bulan pronükleer mikroenjeksiyonda kullanılan pronükleer dönemdeki embriyoların dondurulmasıyla, istenilen zamanda ve eldeki taşıyıcılara uygun sayıda mikroenjeksiyon işlemi gerçekleştirilebilir (43). Ayrıca cinsiyetleri tayin edilmiş, transgenik olarak üretilmiş, ya da buna benzer diğer teknolojiler uygulanmış embriyolar da dondurularak istenilen zamanlarda kullanılabilirler (44).

### **Dondurmada Kullanılan Kriyoprotektan Maddeler ve Solüsyonlar**

Embriyoların dondurulmasında kullanılan kriyoprotektan maddeler dondurma ve çözündürme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan çeşitli maddeler olarak tanımlanabilir (3). Hücre membranından nüfuz edilebilme özelliklerine göre kriyoprotektanları iki ayrı temel grupta inceleyebiliriz: Bunlar hücre membranından geçebilen, yani hücre içerisine nüfuz edebilen (permeating) ve hücre membranından geçemeyen, yani hücre içerisine nüfuz edemeyen (non-permeating) kriyoprotektanlardır. Hücre içerisine nüfuz edilebilen kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlığa sahiptirler ve metanol, etilen glikol, 1.2 propanediol, 2.3 bütanediol, dimetilsülfoksit (DMSO), propilen glikol, gliserol ve diğer bazı alkoller kapsamaktadır (3, 11). Bu grup içerisinde en yaygın biçimde kullanılan kriyoprotektan düşük molekül ağırlıklı bir glikol olan gliseroldür. Önceden de bahsedildiği gibi, spermanın dondurularak saklanması dondurma işleminin zararlı etkilerine karşı koruyucu özelliği keşfedilen ilk kriyoprotektan gliseroldür. Daha sonraki zamanlarda ise, bir çok yeni düşük molekül ağırlığına sahip ve hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar bulunmuş ve spermanın, embriyoların, hücrelerin, dokuların ve organların dondurulması işlemlerinde kullanılmış olup günümüzde de kullanılmaktadırlar. Bu gruptaki kriyoprotektanlar, dondurmada kullanılan solüsyonlar içerisinde mutlaka bulunması gereken maddelerdir. Bu maddelerce yaratılan ozmotik basınç farkından dolayı, donmanın gerçekleşmesinden önce, embriyo hücreleri içerisindeki hücre içi sıvı yukarıda sözü edilen hücre içerisine nüfuz

edebilen kriyoprotektan maddeler ile yer değiştirir ve böylece, hücre hacmindeki değişiklikler azaltılarak ve embriyo hücreleri içerisindeki buz kristallerinin oluşumu minimum düzeye indirilerek dondurma işlemi sırasında hücrelerin zarar görmesi önlenir. Koruyucu etkilerini, suya bağlanabilme özellikleriyle (kolligatif özellik) ve diğer bileşenlerin yüksek konsantrasyonlarından kaynaklanan toksik etkileri azaltarak gösterirler. Bu gruptaki kriyoprotektanların çoğu yüksek oranda suda znebilme yeteneğine ve kayda değer solüsyon ısı etkisine (heats of solution) sahiptirler ki; bu da suyun hidrojen bağlarını kopararak, suyun yapısını değiştirdiklerini göstermektedir. Aynı zamanda, bu kriyoprotektanlar su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilirler. Örneğin; gliserol kendi hidroksil grubu ile su molekülündeki mevcut oksijen arasında hidrojen bağı Őekillendirmektedir. DMSO'in oksijeni ise, suyun protonları ile birleşmekte ve bunun sonucunda da ısı açığa çıkmaktadır. Bunun yanı sıra, kriyoprotektanlar, hücreler yüksek konsantrasyonda tuz ile çevrildiğinde, hücreleri yoğun dehidrasyonun Şekillendiği dönemde korumaktadırlar. Geleneksel yavaş dondurmadan farklı olarak, vitrifikasyon işleminde uygulanan yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanlar, hücreyi camsı (glassy) bir yapıya dönüştürerek istenmeyen buz kristallerince oluşturulacak zararları minimum düzeye indirerek yardımcı olmaktadır (11).

Hücre içine nüfuz edemeyen kriyoprotektanlar ise, kendi aralarında iki ayrı gruba ayrılabilir. Bunlar; hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı (glikoz, sükroz, trehaloz, galaktoz ve diğer bazı Şekerler) ve yüksek molekül ağırlıklı (polivinil alkol; PVA, polivinil pirrolidon; PVP, sodyum hyaluronat, hidroksietil nişasta ve diğer bazı polimerler) kriyoprotektanlardır (3, 11). Hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar dondurma işlemi süresince Şekillenen buz kristalleri oluşumunu azaltan etkilerini soğutmadan önce hücreleri dehidre ederek gösterirler. Pratikte, oosit ya da embriyoların geleneksel tekniklerle dondurulmasında çoğunlukla gliserol, DMSO ya da etilen glikol gibi hücre içine nüfuz edebilen tek bir kriyoprotektan kullanılmaktadır. Oysa, hızlı dondurma ya da vitrifikasyon tekniklerinde genellikle birden fazla kriyoprotektan kullanılmaktadır. Örneğin; sükroz, trehaloz ya da galaktozla birlikte gliserol ve etilen glikol, gliserol ve propanediol veya propanediol ve etilen glikol karışımları kullanılmaktadır. Buradan da anlaşılacağı üzere, hücre içine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar düşük molekül ağırlıklı olup, dondurma işleminde tek başlarına kullanılabilirken, hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanların etkin Şekilde dondurma işlemlerinde kullanılabilmeleri için mutlaka hücre içine nüfuz edebilen kriyoprotektanlardan en az biriyle kombine edilmeleri gereklidir (3, 11).

Hücre içine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıktaki grupta yer alan kriyoprotektanlar ise, etkilerini hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi sırasında oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız olacak biçimde değiştirerek gösterirler (3). Bunlardan başka, albumin (45) fikor (46) ve antifriz protein (AFP) (47, 48) gibi bazı proteinler de hücre içerisine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar içerisinde yer alırlar. Ayrıca, serum da dondurma vasatlarında protein kaynağı olarak kullanılan bir maddedir. Yalnız serumdan kaynaklanabilecek kontaminasyonlar nedeniyle, günümüzde genellikle PVP ya da PVA gibi bazı maddeler serum yerine kullanılmaktadır (3, 45, 49).

### **Embriyoların Dondurulmasında Kullanılan Yöntemler**

Dondurmada kullanılan yöntemleri geleneksel yavaş dondurma (slow freezing), vitrifikasyon ve hızlı dondurma (rapid freezing) olmak üzere başlıca 3 grupta inceleyebiliriz.

#### ***Geleneksel yavaş dondurma (Slow freezing)***

Bu yöntemle embriyoların dondurulmasındaki aşamalar şu şekilde özetlenebilir:

- 1) Embriyoların gliserol, etilen glikol, DMSO ya da propilen glikol gibi hücre içine nüfuz edebilen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlardan birisinin değişik molar konsantrasyonlarındaki solüsyonuna, kriyoprotektan solüsyon ve embriyo arasında ozmotik dengeyi (ekilibrasyonu) sağlamak amacıyla, genellikle oda ısısında bazen daha düşük sıcaklıklarda maruz bırakılmaları,
- 2) Buz kristallerinin oluşumunun  $-5$  ile  $-6^{\circ}\text{C}$ 'ler arasında indüklenmesi (seeding),
- 3) Kontrollü bir biçimde embriyo dondurma makinesi aracılığıyla  $-30$  ile  $-70^{\circ}\text{C}$ 'ler arasındaki bir sıcaklığa ulaşıncaya kadar yavaş soğutma ( $0.2-2.0^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ ),
- 4) İstenilen sıcaklığa ulaşıldığında, sıvı azot ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) içerisine daldırma ve saklama,
- 5) Yaklaşık olarak dakikada  $250^{\circ}\text{C}$  azalacak şekilde kontrollü çözündürme.

Örneğin, bu işlem karıştırılmayan  $25^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda kolaylıkla gerçekleştirilebilir,



6) Embriyoların kültüre alınması ya da taşıyıcılara transferlerinden önce kriyoprotektan maddelerin uzaklaştırılması.

Bu aşamaların tümü, başarılı bir embriyo dondurma işleminde ayrı bir öneme sahiptir (3, 42).

Yakından incelendiğinde, dondurucu soğuklara karşı tolerans gösteren hayvanlarca geliştirilmiş olan mekanizmaların, memeli oosit ya da embriyolarının geleneksel yavaş dondurma yöntemleriyle dikkate değer bir benzerlik gösterdiği gözlenmektedir (50, 51). Bu tür hayvanların dondurucu soğuklarda donduktan sonra da yaşamlarını sürdürebilmelerindeki temel faktör, bu hayvanlarca glikoz ve gliserol ile diğer bazı polihidrik alkoller ve şekerlerin değişik varyeteleri gibi düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanların yüksek miktarlarda üretilmesidir. Hücre içine nüfuz edebilen bu kriyoprotektanlar, donma ve çözünme sürecinde, hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek hücre yapısını korurlar (3). Hücre içi içerik, toksik olmayan ve hücre içine nüfuz edebilen kriyoprotektanın yüksek konsantrasyonlarında dengelendiğinde ve sıcaklığın 0°C'nin altına düştüğü durumlarda buz kristallerinin gelişimi donmaya karşı tolerans gösteren hayvanlarda spesifik buz çekirdeklerini oluşturan proteinlerce (specific ice-nucleating proteins) indüklenir. Seeding diye de adlandırılan buz kristallerinin oluşumunun indüklenmesi, ani ve hızlı soğumayla (supercooling) birlikte kendiliğinden ve kontrolsüz biçimde buz çekirdeklenmesinin şekillendiği dönemde hızlı dondurmanın zararlı etkilerini önler (52). Buz kristallerinin oluşumu indüklendiğinde, küçük buz kristallerinde daha büyük kristallere dönüşüm yönünde bir eğilim şekillenir ki; bu durum hücreler için ölümcül olup kesinlikle önlenmelidir. Bunun önlenmesi için, laboratuvarlarda buz kristallerinin oluşumu yavaş soğutma oranlarının (dakikada 2°C'den daha az) uygulanmasıyla kontrol edilmektedir. Böylece, dondurma işlemi süresince hücrelerin dehidre olmaları sağlanır. Donmaya karşı tolerans gösteren hayvanlar ise, antifriz proteinler diye adlandırılan yüksek molekül ağırlıklı bileşenleri kullanırlar. Donmaya karşı tolerans gösteren hayvanlarda, buz çekirdeklerinin oluşumunu sağlayan proteinlerin ve antifriz özellik taşıyan proteinlerin birlikte bulunması sayesinde, buz kristallerinin büyüklüğü kontrol edilir ve hücrelerin donması esnasında dehidre olması sağlanır (53).

## *Vitrifikasyon*

Vitrifikasyon hücrelerin, dokuların ve organların düşük sıcaklıklarda hücre içerisinde tamamıyla vitröz ya da camsı bir durumun yaratılmasıyla dondurulmasını anlatan bir terimdir. Bu yöntemde buz kristalleri hiç şekillenmemektedir. Bu olgu ilk kez fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir (30). Bu başarıdan sonra geçen zaman diliminde, vitrifikasyon yönteminin basitliği, düşük maliyeti ve uygulanan prosedürün kısa olması gibi avantajlarına karşın, kullanımını genellikle deneysel düzeyde kalmıştır. Günümüze değin olduğu gibi günümüzde de, ticari embriyo transfer amaçlı dondurma uygulamalarında geleneksel yavaş dondurma yöntemi kullanılmış ve kullanılmaktadır (54). Başarılı bir vitrifikasyon olgusu için, viskozitede had safhada bir artış gerekmektedir. Bunun için de ya hızlı soğutma oranları (teorik olarak yapılan hesaplamalara göre yaklaşık saniyede 107°C'lik bir soğutma hızıyla saf suyun da vitrifiye olacağı bildirilmiştir) (55); ya da düşük sıcaklık derecelerinde viskoziteyi artıran ve buz kristallerinin formasyonunu baskılayan kriyoprotektan solüsyonların kullanımı gerekmektedir (54). Son zamanlara kadar yaygın şekilde kullanılan vitrifikasyon prosedürlerindeki 0.25 ml'lik payetlerin sıvı azot içerisine direkt olarak daldırılmasıyla sağlanan en yüksek soğutma oranı, yaklaşık olarak dakikada 2500°C olarak sınırlı kalmıştır (3). Diğer taraftan, payetler içerisindeki embriyo ve zona pellusidalarda oluşacak çatlama ve kırılmaları önlemek amacıyla yukarıda sözü edilen soğutma ve ısıtma oranlarının tümüyle uygulanamayacağı da bildirilmiştir (56, 57). Vitrifikasyonda uygulanan soğutma oranları kriyoprotektanların yaklaşık 5-7 molar gibi yüksek konsantrasyonlarını gerektirmektedir. Bu oran geleneksel yavaş dondurmadaki konsantrasyonların (1-2 M) yaklaşık 2-3 katıdır (58). Vitrifikasyonda kriyoprotektanların dondurma işleminde buz oluşumunu baskılamaları önemli bir unsurdur ve sıcaklık düştükçe, solüsyon tümüyle viskoz bir hal alarak sonunda camsı bir faza geçer. Farklı kriyoprotektanların suyla oluşturulan solüsyonlarının camsı faz oluşturma özelliklerinin değişken olduğu gösterilmiştir. Bunun da muhtemel nedeninin, her bir kriyoprotektanın vitrifikasyonun gelişmesine yardımcı olmada ya da donmaya olan eğilimi azaltmada, su molekülleri ile olan etkileşimlerindeki farklılık olduğu bildirilmektedir (3, 59).

Pratik soğutma oranlarında vitrifikasyonun sağlanması için kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonlarının (>%30) kullanılması gerektiğinden, ilgili kriyoprotektanların toksisiteleri vitrifikasyonda önemli bir rol oynamaktadır (60). Günümüzde üzerinde hala

çalışılan konuların başında, biyolojik materyallerle ekilibre edildiğinde, hücrelere toksik etki yapmayan vitrifikasyon solüsyonlarının bulunması gelmektedir. Yüksek konsantrasyonlardaki kriyoprotektanların toksik etkilerini en aza düşürmek için, ekilibrasyon zamanının kısaltılması, iki aşamalı ekilibrasyon ve toksisiteyi azaltan sükröz, trehaloz, formamid gibi bazı maddelerin kullanılması önerilmiştir (3). Öldürücü buz kristallerinin oluşumunun dondurma aşamasındakine kıyasla çözündürme aşamasında daha hızlı şekillendiğı gösterilmiştir (61). Bu nedenle, embriyoların vitrifikasyondan sonra canlılıklarını sürdürebilmeleri, aynı zamanda, devitrifikasyon sırasında meydana gelebilecek zararların da önlenmesine bağılıdır. Sulu solüsyonlarının dondurma ve çözündürme işlemleri boyunca camsı bir faz şekillendirdiğı gösterilen polietilen glikol ve 2.3 bütanediol gibi maddeler, aynı zamanda gliserolle karşılaştırıldığında, hücrelere çok daha hızlı penetre olduğundan, vitrifikasyon solüsyonlarında kullanılan ideal kriyoprotektan maddeler olarak bildirilmiştir (3). Fikol (46), antifriz proteinler (47) ve sodyum hyaluronate (61) gibi yüksek molekül ağırlıklı maddeler kriyoprotektan solüsyonların vitrifikasyon özelliklerini artırır ve çözündürme sürecinde devitrifikasyonu önlerler. Ancak, *in vitro* üretilmiş sığır blastosistleri etilen glikol-sükröz solüsyonuyla herhangi bir vitrifikasyon özelliğini artırıcı madde kullanılmadan başarıyla vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmuşlardır. Bu tür moleküllerin vitrifikasyon solüsyonlarında bulunmaması çözündürme esnasında net bir devitrifikasyonla sonuçlanmıştır ki; bu da buz kristallerinin dondurma aşamasına göre çözündürme aşamasında daha kolay şekillendiğini doğrulamaktadır. Ancak, çözündürme sürecinde şekillenen devitrifikasyon olgusu çözündürme sonrası embriyoların canlılıklarını korumada olumsuz etki göstermemiştir (61). Farelerde yapılan başka bir çalışmada dondurma aşamasında vitrifikasyon solüsyonunda şekillenen kristalizasyonun embriyolara zarar vermediğı bildirilmiştir (62). Bu nedenle, dondurma aşamasındaki gözlenebilir kristalizasyon ve çözündürme aşamasındaki yeniden şekillenen kristalizasyonun embriyolara zararsız olması, buz kristallerinin hücre dışında şekillendiğini ve embriyoların içerisinde herhangi bir kristallenmenin ya da değışikliğin olmadığının göstergesi olarak kabul edilmektedir (3). Tartışmalı da olsa, başarı ile gerçekleştirilen dondurma yöntemlerinin hemen tümünde vitrifikasyonun bir dereceye kadar embriyo ya da oositlerin içinde ve etrafındaki solüsyonların konsantrasyonuna bağılı olarak aşamalı şekilde gerçekleşen buz formasyonu sonucunda oluştuğı bildirilmiştir (63). Karışıklığı önlemek için kriyobioloji ve embriyolojide vitrifikasyon terimi, biyolojik materyali içeren solüsyonun tümüyle vitrifiye olduğu yöntemler için kullanılmaktadır (54). Geleneksel yavaş dondurma ile ve

vitrifikasyonla dondurulan evcil hayvan embriyolarının *in vitro* ve *in vivo* gelişim oranlarını karşılaştıran bir çok çalışmada eşit sonuçlar ya da vitrifikasyon lehine sonuçlar bildirilmiştir (20, 64-70).

Sığırlarda yapılan bir çalışmada, blastosist aşamasındaki embriyolar vitrifikasyonla dondurulmuştur. Dondurma işleminde *in vitro* üretilmiş 6-7 günlük embriyolar beşer dakika süre ile sırasıyla %10 gliserol ve %10 gliserol + %20 etilen glikole ve sonrasında da 30 saniye süreyle %25 gliserol + %25 etilen glikole maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlara dayanarak, yukarıdaki vitrifikasyon protokolü ile daha geniş blastosistlerin daha küçük olanlara kıyasla daha fazla oranda canlı kaldıkları bildirilmiştir (71).

Soğutma ve ısıtma oranlarının daha da artırılmasının faydalı etkilerinin (kriyoprotektan konsantrasyonunun ve toksisitesinin azalması, soğüğün zararlı etkisinin daha da azaltılması gibi) bilinmesine karşın, bu konuda yeterince çalışma yapılmamıştır. Geleneksel olarak kullanılan payet ve kriyovialler (dondurulmuş hücrelerin saklanmasında kullanılan 1.5-1.8 ml'lik özel tüpler) bu amacı gerçekleştirmek için ideal malzeme değildir ve her ikisinin de yaygın olarak vitrifikasyonda kullanılması var olan seçenekleri de kısıtlamıştır.

Bazı alternatif soğutma ve ısıtma yöntemlerinin kullanılması yaklaşık 10 yıl önce başlamış ve son yıllarda bu konu ile ilgili başarılı sonuçlar alınmıştır. Yeni geliştirilen bu hızlı soğutma tekniklerinin hemen hemen tümü kriyoprotektan solüsyon ve sıvı azot arasındaki direkt temas ilkesine dayanmaktadır (54). Bu amaçla uygulanan en basit yöntem embriyoları içeren solüsyonun direkt olarak sıvı azot içerisine daldırılması olmuştur (72, 73). Ancak, bu yöntemde embriyoyu taşıyan damlaların büyük (5-6 µl) olması ve sıvı azot içerisine batmadan önce sıvı azot yüzeyinde yüzmesinden dolayı, soğuma oranı göreceli olarak düşük olmaktadır. Kullanılacak bir taşıyıcı aracın bu problemin çözümünde yararlı olabileceği bildirilmiştir (54). Bu amaçla *Drosophila melanogaster* embriyolarının vitrifikasyonunda (74,75) elektron mikroskop ızgarasının (electron microscope grid) taşıyıcı araç olarak başarıyla kullanılmasının ardından, aynı şekilde sığır oosit ve embriyoları da vitrifiye edilmiştir (76-78).

Vajta ve arkadaşlarınca (79) geliştirilen açık çekilmiş payet (open pulled straw, OPS) yöntemi de bu amaçla geliştirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmış bir yöntemdir (80, 81). Bu yöntemde normal 0.25 ml'lik payetler orta kısımlarından sıcak bir yüzey üzerinde ısıtılmış ve daha sonrasında her iki uçtan çekilerek payetin uzaması ve orta kısmının incilmesi sağlanmıştır. Payetler orta kısımdaki en ince noktadan jilet ya da benzeri bir kesici ile kesilerek vitrifikasyon işlemi için hazır hale getirilmiştir. İçerisinde embriyo ya

da oositlerin bulunduğu 1-2 µl'lik vitrifikasyon damlacıkları payetin dar ucunun yaklaştırılması sonucunda kapiller çekim etkisiyle payet içerisine alınmış ve direkt olarak sıvı azot içerisine daldırılmıştır. Böylece, dakikada 20.000°C'nin üzerinde bir soğuma hızına ulaşılmış ve sıvı azotta dondurma işleminden önce vitrifikasyon solüsyonu içerisinde bekleme süresi bakımından da 30 saniyenin altına inilmiştir. Elde edilen bu avantajlarla yüksek yoğunluktaki kriyoprotektanların zararlı etkileri en aza indirilmiştir. Çözündürme işlemi, payetin ince ucunun direkt olarak embriyo yıkamada kullanılan herhangi bir vasatın içerisine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Balık embriyolarının dondurulmasına ilişkin bazı çalışmalar da bulunmaktadır (82, 83). Ancak, balık embriyolarının dondurulmasında büyük güçlükler söz konusudur. Bunları sıralayacak olursak; balık embriyoları düşük yüzey- büyük hacim oranına sahiptir ve bu da su ve kriyoprotektan madde giriş ve çıkışını yavaşlatmaktadır. Değişik ozmotik özelliklere sahip blastoderm ve yumurta sarısı denilen iki kısımdan oluşan yapı, her iki kısım içinde optimum olacak protokollerin geliştirilmesini güçleştirmektedir. Soğutulmaya karşı gözlenen duyarlılığın fazla olması, geleneksel yavaş dondurma protokollerinin uygulanmasını engellemektedir. Son olarak, kriyoprotektanlara karşı var olan bariyerlerden dolayı, embriyolara kriyoprotektanların geçişi yetersiz olmakta ve bunun sonucunda da başarılı bir vitrifikasyon şekillenmemektedir (82).

### ***Hızlı dondurma (Rapid freezing)***

Hızlı dondurma, hızlı soğutma oranlarının (dakikada yaklaşık 1250°C) uygulanmasından önce hücrelerin kısmen dehidre edildiği dondurma işlemi tanımlamak için kullanılır. Bu yöntemle başarılı bir dondurma işleminin gerçekleşmesindeki ön koşul gliserol, propendiol, DMSO ya da etilen glikol gibi hücre içine nüfuz eden kriyoprotektanlardan birisinin 2-4.5 M'lık ve sükroz, trehaloz, laktoz ya da galaktoz gibi hücre içine nüfuz edemeyen kriyoprotektanlardan birisinin 0.25-0.5 M'lık karışımlarından oluşan dondurma solüsyonlarının kullanılmasıdır (21, 84). Yaklaşık 30 saniye ile 3 dakika arasındaki kısa bir ekilibrazyondan sonra, embriyolar kısmen dehidre duruma geçerler ve bu aşamada embriyolar sıvı azot buharında orta derecelerdeki bir sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra, sıvı azot içerisine daldırılırlar. Vitrifikasyondan farklı olarak, hızlı dondurmada hücre dışı sıvı donar ve dondurma solüsyonunun ozmolaritesi artar. Bu da embriyo hücrelerinden daha çok donabilir suyun kaybına neden olur. Buna karşın, tüm bu

şartlar altında; eğer çözündürme işleminde uygun olmayan ısıtma oranları uygulanırsa, hücre içi buz kristalleri şekillenebileceğinden, embriyo zarar görebilir (3).

### **Embriyoların Çözündürülmesi**

Çözündürme işlemi, genellikle değişik ısı derecelerindeki su içerisine dondurulmuş embriyoların daldırılması ve burada belirli süreler bekletilmesiyle uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, çözündürme işlemi embriyoları taşıyan payetler sıvı azottan çıkarıldıktan sonra, genellikle direkt olarak 20-37°C'deki su banyosu içerisine 10-20 saniye süreyle bırakılarak gerçekleştirilmektedir (23, 85-87). Daha sonra, kriyoprotektan maddelerin zararlı etkilerini önlemek amacıyla zaman geçirilmeden bu maddelerin uzaklaştırılması işlemine geçilir (3, 87).

### **Kriyoprotektanların Uzaklaştırılması**

Yukarıdaki açıklamalardan da anlaşılacağı gibi, kullanılan kriyoprotektanlar embriyolar için toksik etkilidir. Ayrıca, kriyoprotektanların sebep olduğu ozmotik şok da embriyolar üzerinde olumsuz etki yapmaktadır. Bu sebeplerden ötürü, çözündürme sonunda bunların embriyo hücrelerinden ve embriyoların buldukları ortamlardan uzaklaştırılması gerekmektedir ve bu işlemin doğru şekilde yapılması çözündürme sonrası canlılığın devamı için kritik bir önem arz etmektedir (11). Kriyoprotektanların uzaklaştırılması için sükroz veya trehaloz gibi hücre içine nüfuz edemeyen maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerin ortamda bulunması sonucu kriyoprotektan hücre dışına çıkar. Bu işlem ya tek bir aşamada ya da 3 aşamada gerçekleştirilir. Tek bir aşamada yapılan kriyoprotektan uzaklaştırılmasında genellikle sükrozun değişik konsantrasyonları (0.5, 1 M vs.) yaygın şekilde kullanılmaktadır (16, 27, 88). Sükrozdan başka, trehaloz (89) ve galaktoz (34, 71) gibi diğer şekerler de aynı amaç için kullanılan bazı maddelerdir. Kriyoprotektanın tek aşamalı uzaklaştırılması ile direkt transfere olanak sağlanmıştır. Bunun için, genellikle 0.25 ml'lik payet içerisine öncelikle kriyoprotektanın uzaklaştırılması için kullanılacak solüsyon çekilir. Hava boşluğu bırakıldıktan sonra, dondurma solüsyonuyla birlikte embriyolar ve ikinci bir hava boşluğundan sonra, tekrar kriyoprotektanın uzaklaştırılması için kullanılacak solüsyon çekilir ve payetin uç kısmı

kapatılarak embriyolar dondurulur. Çözündürme işleminden hemen sonra, payet sallanarak solüsyonların karışması sağlanır ve payet transfer pipeti içerisine yerleştirilerek embriyo direkt olarak transferde kullanılabilir (28, 29, 33). Şayet embriyo kalite yönünden değerlendirilecek ise, aynı karıştırma işlemi yapıldıktan sonra petri kutusu içerisine payet içeriği boşaltılabilir ve embriyolar değerlendirilebilir.

Kriyoprotektanların 3 aşamada uzaklaştırıldığı durumlarda ise, kademeli şekilde azalan konsantrasyonlarda gliserol (87), sükroz (68, 86) veya benzeri bir maddeyi içeren 3 ayrı solüsyonda belirli sürelerle bekletilerek kriyoprotektan uzaklaştırılır. Daha sonra embriyolar embriyo yıkamada kullanılan vasatlar içerisinde yıkanılır. Yapılan bir çalışmada, sükrozun 0.5, 0.25 ve 0.1 M konsantrasyonlardaki solüsyonlarından geçirilerek uygulanan kriyoprotektan uzaklaştırılma işleminin tek bir aşamada 0.5 M sükroz içerisinde uygulanan kriyoprotektan uzaklaştırma işleminden farklı bir sonuç vermediği bildirilmiştir (90).

### **Embriyo Dondurma ve Çözündürme İşlemlerinde Başarı Oranını Etkileyen Faktörler**

Birçok memeli türünün embriyolarının başarılı şekilde dondurulmuş olmasına karşın, çözündürme sonrası elde edilen başarı oranları türler arasında değişiklik göstermektedir. Buna örnek olarak, domuz embriyolarının dondurma işlemine karşı gösterdikleri duyarlılık verilebilir. Bunun da olası sebebinin, embriyoların sahip oldukları yağ içeriği olduğu bildirilmiştir (3, 91-93). Başarılı bir dondurma işleminde soğutma ve ısıtma oranları da önemli faktör olarak göze çarpmaktadır (3). Ayrıca, dondurma işleminde kullanılan kriyoprotektan maddeler ve bunların değişik konsantrasyonları ile değişik kriyoprotektan karışımlar da dondurma ve çözündürme sonrası başarı oranına etkiyen faktörler arasında yer almaktadır (23, 33, 90, 94). Bunun yanı sıra, embriyoların büyüklükleri ve gelişim dönemleri de çözündürme sonrası başarı oranını etkilemektedir (3, 21). Bunlardan başka, hücrelerin geçirgenlik özellikleri (95) ile kriyoprotektanların ozmotik özellikleri ve toksisiteleri de başarı oranında önemli rol oynayan unsurlar arasında yer almaktadır (3, 96). Daha önce de değinildiği gibi, hücrelerin içerdikleri yağ oranı dondurma işlemindeki başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir. Bu durum özellikle yüksek yağ içeriğine sahip domuzlarda dikkati çekmektedir. Ushijima ve arkadaşları (97) *in vitro* olgunlaştırılan ve fertilize edilen morula döneminden önceki sığır embriyolarında santrifüj

işleminde sonra sitoplazmik yağ damlacıklarını mikromanipülatör yardımıyla uzaklaştırarak sığır embriyolarının dondurma işlemine karşı gösterdikleri toleransı incelemişler ve sitoplazmik yağ damlacıklarının morula döneminden önceki gelişim döneminde olan sığır embriyolarından uzaklaştırılmasının dondurmada kaynaklanabilecek zararlara karşı toleransı geliştirdiğini bildirmişlerdir. Osmotik farktan kaynaklanan şişme (osmotic swelling) de memeli embriyoların canlılıklarını korumalarında önemli rol oynamaktadır. Dondurulmuş hücreler çözündürmeden hemen sonra genişleme riski taşımaktadır. Çünkü, hücreler kriyoprotektan madde (hücre içerisine nüfuz edebilen) içermektedirler ve su kriyoprotektan maddelerin hücre dışına çıkmalarından daha hızlı bir şekilde hücrelerin içlerine geçmektedir. Bu durumda, eğer hücreler kritik bir hacmin üzerinde genişlerlerse, embriyolar geri dönüşümü olanaksız derecede zarar görürler (22).

### **Oositlerin Dondurulması**

Son yıllarda embriyoların yanı sıra oositlerin dondurulması konusunda da yoğun çalışmalar yapılmaktadır (31, 49, 98-104). Ancak, embriyoların dondurulması ile karşılaştırıldığında başarı oranının daha düşük olduğu görülmektedir. Oositlerin dondurulması hem insanlarda uygulanan yardımcı üreme teknikleri hem de ovaryumdan kaynaklanan bazı infertilite durumlarında fertilitenin yeniden şekillendirilmesi ve uzatılması bakımından bazı pratik ve etik avantajlara sahiptir. Bilindiği üzere spermanın ve embriyoların dondurularak saklanması günümüzde *in vitro* fertilizasyon kliniklerinde yaygın ve rutin olarak kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır (35). Ayrıca, bilimsel açıdan ise, günümüzde yoğun olarak çalışılmakta olan klonlama çalışmalarında dondurulmuş oositlerin kullanılabilmesi büyük kolaylık sağlayacaktır (49).

Bazı çalışmalarda, fare oositlerinin kriyoprezervasyon işleminde kullanılan solüsyonlardaki sodyumun zararlı etkileri gösterilmiştir (105). Bu tür bir zararlı etkiyi azaltmak ya da ortadan kaldırmak için, dondurma solüsyonu içerisindeki sodyumun konsantrasyonunun azaltılması ve sodyum yerine kolinin kullanılmasının yararlı etkilerinin olduğu bildirilmiştir (102, 106).



## GEREÇ VE YÖNTEM

### Çalışmada Kullanılan Hibrit Fareler

Yapılan çalışma TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Transgen ve Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Hayvanların bakım ve kullanımlarında ilgili uluslararası kurum ve TÜBİTAK tarafından onaylanmış prosedürlere uygun hareket edilmiştir. Çalışmada 6-8 haftalık toplam 80 adet dişi hibrit CB6F1 (C57BL/6J X BALB/C) fare kullanılmıştır. Üniteye bulunan tüm fareler *ad libitum* beslenmiş ve kullanılan yem, su ve altlık malzemelerinin tümü otoklavdan geçirilmiştir. Erkek fareler bireysel olarak ayrı ayrı, dişiler ise 5-10'lu gruplar halinde aynı kafeslerde tutulmuşlardır. Ayrıca, üniteye 14 saat aydınlık 10 saat karanlık ışık döngüsü uygulanmıştır. Üniteye sıcaklık ve nem ise, sırasıyla  $21\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  ve %50-60 olacak şekilde ayarlanmıştır.

### Süperovulasyon

Altı-sekiz haftalık hibrit dişi farelerin, 48 saat aralıklarla intra peritoneal yoldan uygulanan 5'er IU gebe kısarak serum gonadotropin (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG; Sigma G-4877) ve insan koryonik gonadotropin (human Chorionic Gonadotropin, hCG; Pregnyl, Organon) enjeksiyonlarıyla süperovulasyon yapmaları sağlanmıştır. Hormon enjeksiyonları uygulama günleri saat 13.00'de gerçekleştirilmiştir. hCG enjeksiyonunu takiben dişi fareler bireysel olarak barındırılan damızlık erkek farelerin kafeslerine bire bir olacak şekilde konulmuştur. Ertesi sabah tüm dişiler çiftleşmenin göstergesi olan vaginal plak açısından kontrol edilmiştir (107). Vaginal plak gösteren dişiler toplanarak tek bir kafeste embriyo eldesine kadar beraberce barındırılmıştır.

### Embriyo Toplama Pipetlerinin Hazırlanması

Embriyoların toplanması ya da bir yerden bir yere aktarılması için bir adet ağız hortumuyla birlikte satılan 50 µl'lik mikrokapiller pipetler (Sigma P-1049) kullanılmıştır. Kapiller pipet her iki ucundan tutularak gaz ocağında, camın orta noktasının yumuşadığı

gözlemleninceye kadar ısıtılmıştır. Yumuşama gözlenir gözlenmez pipet alevden uzaklaştırılmış ve her iki ucundan zıt yönlerde çekilmiştir. Bu şekilde çekilen kısmın çapı yaklaşık 120-180 µm olmuştur. Pipetin her iki ucunun birbirine yaklaştırılması ile, çekilen kısmın ortadan kırılması sağlanmıştır. Son olarak, çekilen kısmın, pipetin kalın kısmından sonraki 2-3 cm uzaklıktan bir kesici taş yardımıyla düzgünce kırılması sağlanmış ve ağız pipeti setinin ucuna hazırlanan pipet takılmıştır (107).

### **Embriyoların Yıkanmasında ve Kültüre Edilmesinde Kullanılan Vasatlar**

Embriyolar dış ortamda, yani inkübatörün dışında yapılan manipülasyonlar sürecinde HEPES'le tamponlanmış vasatlarda tutulurlar. Fare embriyoları açısından en yaygın olarak kullanılan vasat M2 vasatıdır. Sunulan çalışmada da M2 vasatı kullanılmıştır. M2 vasatının hazırlanışına ilişkin formülasyon Tablo 1'de gösterilmiştir (108). Embriyoların kültüründe ise, son yıllarda fare embriyoları için yaygın biçimde kullanılan CZB (Chatot-Ziomek-Bavister) vasatı seçilmiştir. CZB vasatının formülasyonu Tablo 2'de gösterilmiştir (109).

Hazırlanan her iki vasat 0,22 µm'lik filtrelerle filtre edilerek steril hale getirildikten sonra, 1 hafta süreyle +4°C'de saklanmıştır. Kullanım günlerinde ise, M2 37°C'lik etüve kaldırılmıştır. Ayrıca, 35 mm'lik petri kutusu içerisinde 50 µl'lik M2 damlası konularak üzeri mineral yağ (Sigma M-8140) ile kaplanmış ve elde edilen embriyoların, elde edilmelerinden dondurulmalarına kadar geçen süreç içerisinde saklanması için kullanılmak üzere 37°C'lik etüve kaldırılmıştır

### **Embriyo Kültür Kaplarının Hazırlanması**

Embriyoların çözündürme sonrası kültürü için 35 mm'lik steril petri kutuları kullanılmıştır. Öncelikle, embriyo kültürü için, petri kutusunun tabanına 50 µl'lik CZB damlaları otomatik pipet aracılığı ile yerleştirilmiştir. Daha sonra, hem kontaminasyondan korumak hem de inkübatördeki ısının etkisiyle buharlaşmanın önlenmesi amacıyla damlaların üzeri mineral yağ (Sigma M-8140) ile bütünüyle kaplanmıştır. Bir petri kutusunda genellikle 8 adet 50 µl'lik damla hazırlanmıştır. Kültür vasatlarının pH'ları bikarbonatla tamponlandığı için, bu vasatların %5 CO<sub>2</sub>'li etüv şartlarında tutulmaları

gerekmektedir (110, 111). Embriyoların pH değişiminden zarar görmesini önlemek amacıyla, kültür kapları hazırlandıktan sonra, embriyoların transfer edilmesinden en az 2 saat önce %5 CO<sub>2</sub>, 37°C ve yüksek nemli (minimum %95) inkübatör şartlarına konarak damlalardaki vasatın ekilibre olması sağlanmıştır (107).

**Tablo – 1 M2 Yıkama Vasatının Hazırlanması**

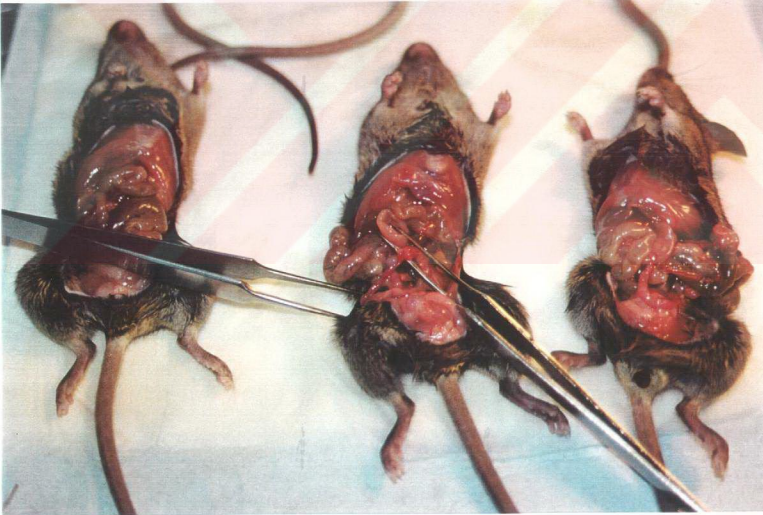
Bileşik	mM	Molekül Ağırlığı	gr/litre
NaCl	94.66	58.450	5.533
KCl	4.78	74.557	0.356
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.71	147.200	0.252
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19	136.091	0.162
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.19	246.500	0.293
NaHCO <sub>3</sub>	4.15	84.020	0.349
HEPES	20.85	238.300	4.969
Sodyum laktat	23.28	112.100	2.610
			veya 3.345 ml %60'lik şurubundan
Sodyum piruvat	0.33	110.000	0.036
Glikoz	5.56	179.860	1.000
BSA			4.000
Potasyum Penisilin G			0.060
Streptomisin sülfat			0.050
Fenol red			0.010
Enjeksiyonluk H <sub>2</sub> O			1 lt

**Tablo – 2 CZB Kültür Vasatının Hazırlanması**

Bileşik	mM	Molekül Ağırlığı	mg/50 ml
NaCl	81.62	58.44	238.50
KCl	4.83	74.56	18.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.18	136.09	8.00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.18	246.30	14.52
NaHCO <sub>3</sub>	25.12	84.01	105.50
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.70	147.00	12.50
Sodyum laktat	31.30	112.10	175.64
			veya 134.0 ml %60'lik şurubundan
Sodyum piruvat	0.27	110.00	1.48
EDTA	0.11	372.24	2.04
Glutamin	1.00	146.10	7.30
Potasyum Penisilin G			3.00
Streptomisin sülfat			35.00
BSA			250.00
Enjeksiyonluk H <sub>2</sub> O			50 ml

## Embriyoların Elde Edilmesi

Çalışmada iki farklı gelişim dönemindeki embriyolar kullanılmıştır. Bunlar morula ve blastosist dönemleridir. Dolayısıyla, embriyoların eldesinde farklı yöntemler kullanılmıştır. Morula eldesinde, yaklaşık 2.5 günlük gebe fareler, blastosist eldesinde ise, yaklaşık 3.5 günlük gebe fareler kullanılmıştır. Embriyo eldesinde kullanılan tüm farelere servikal dislokasyon uygulanmıştır. Daha sonra, farelerin karın bölgeleri % 70'lik alkolle temizlenmiştir. Karın bölgesinin orta hattında deriye medyan hatta dik küçük bir ensizyon yapıldıktan sonra, deri kesik bölgeden baş ve arka ayaklar yönünde çekilerek sıyrılmıştır. Karın duvarı iç organlara rahatça ulaşılabilir biçimde açılmıştır. Buraya kadar yapılan işlemler hem morula hem de blastosist aşamasındaki embriyoların eldesi için aynı şekilde uygulanmıştır. Bundan sonraki aşamalarda ise, farklı yöntemler uygulanmıştır. Şekil 1'de karın bölgesi açılmış farelerde dişi genital kanalların genel görünümü verilmiştir.



Şekil – 1 Karın bölgesi açılmış farelerde dişi genital kanalların genel görünümü

Morula eldesinde, öncelikle pens ile kornu uteri bulunarak yukarı doğru çekilmiştir. Daha sonra, bir pens uterus ile oviduktun birleştiği bölgeye yerleştirilip hafifçe çekilerek

oviduktun ovaryumdan uzaklaşması sağlanmıştır. Ovidukt, makas yardımı ile, ovaryum ve kornu uteriyle birleşme noktalarından kesilerek dışarı alınmıştır. Aynı işlem diğer ovidukt için de uygulanmıştır. Dışarı alınan oviduktlar daha sonra, içerisinde fare embriyoları için yaygın olarak kullanılan M2 yıkama vasatı bulunan petri kutusu içerisine aktarılmıştır. Buradan da oviduktlar 10 cm'lik petri kutusu içerisindeki 150-200 µl'lik M2 damlaları içerisine birer adet olacak şekilde aktarılmıştır. M2 vasatı ile doldurulmuş ve ucunda 30 g.'luk iğne takılı insülün enjektörünün iğnesi stereo mikroskop altında oviduktun infundibulumundan içeri sokularak enjektör içerisindeki vasatla oviduktlar yıkanmıştır. Bu işlem yapılırken oviduktların diğer uçlarından embriyoların döküldüğü gözlemlenmiştir. Oviduktların tümünün yıkama işleminin tamamlanmasıyla, her bir M2 damlası içerisindeki embriyolar M2 vasatı içerisinde 3 kez yıkandıktan sonra, içerisinde üzeri mineral yağ ile kaplı 100 µl M2 vasatı bulunan 35 mm'lik petri kutusuna aktarılmıştır. Aktarılan bu embriyolar dondurma işleminin uygulanmasına dek geçen süre içinde, 37°C'lik kuru etüvde tutulmuşlardır (107).

Blastosistlerin eldesinde ise, ilk olarak serviks uteri bulunmuş ve kesilmiştir. Serviks pens ile tutularak uterus yukarı doğru çekildikten sonra, uterusu kuşatan yağ ve bağ dokular dikkatlice makas ve pens yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Elde edilen uteruslar 10 cm'lik petri kutusu içerisindeki 150-200 µl'lik M2 damlaları içerisine, damla başına birer adet olacak şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra, uteruslar ucunda 25 G'luk iğne bulunan ve M2 vasatı ile dolu olan insülün enjektörünün serviksten sokularak her iki kornu yönünde sıvı akışı sağlanmasıyla yıkanmıştır. Yıkama sırasında, kornuların uç kısımlarından blastosistlerin vasat içerisine döküldüğü gözlenmiştir. Uterusların yıkama işlemlerinin tamamlanmasını, her bir M2 damlası içerisindeki embriyoların M2 vasatı içerisinde 3 kez yıkanması izlemiş ve embriyoların, içerisinde üzeri mineral yağ ile kaplı 100 µl M2 vasatı bulunan 35 mm'lik petri kutusuna aktarılmasıyla tamamlanmıştır. Aktarılan bu blastosistler dondurma işleminin uygulanmasına dek geçen süre boyunca, 37°C'lik kuru etüvde tutulmuşlardır (107).

### **Vitrifikasyon İşleminde ve Çözündürme Sonrası Kriyoprotektan Maddelerin Uzaklaştırılmasında Kullanılan Vasatlar**

Embriyoların dondurulmasında iki farklı vitrifikasyon solüsyonu kullanılmıştır. Bunlar VS3 ve EG solüsyonlarıdır. Bu solüsyonların hazırlanmasında kullanılan maddeler

gliserol (Sigma G-5516), polietilen glikol (Sigma P-2139), etilen glikol (Sigma E-9129) ve sükröz (Sigma S-1888)'dur. Birinci yöntemde, VS3 solüsyonu kullanılmıştır. İşlemden iki farklı yoğunlukta VS3 solüsyonu hazırlanmıştır. Bunlardan birisi ekilibrasyon, diğeri ise vitrifikasyon işlemi için hazırlanmıştır. Ekilibrasyon işlemi için %25 VS3 (M2 vasatı içinde hazırlanmış 1.625 M gliserol ve %1.5 polietilen glikol), vitrifikasyon işlemi içinse, %100 VS3 (M2 vasatı içinde hazırlanmış 6.5 M gliserol ve %6 polietilen glikol) kullanılmıştır. Her iki solüsyonun hazırlanmasında kullanılan formülasyonlar değişik hacimler için Tablo 3 ve 4'de gösterilmiştir. Kullanılan solüsyonlar modifiye edilmeden hazırlanmıştır (16). Birinci yöntem VS3 ile vitrifikasyon yöntemi diye adlandırılmıştır.

**Tablo – 3** Vitrifikasyon Solüsyonu, %100 VS3 [6.5 M Gliserol + %6 PEG (MW=8000)]

Bileşen	/10 ml*	/25 ml*	/50 ml*
Gliserol	4.8 ml	12 ml	24 ml
PEG	0.6 gr	1.5 gr	3 gr
M2	5.2 ml	13 ml	26 ml

\*Hazırlanan %100 VS3 solüsyonundan %25 VS3 solüsyonu hazırlarken kullanıldığından, kalan miktar %25 VS3 solüsyon miktarı ile aynı olmuştur.

**Tablo – 4** Ekilibrasyon Solüsyonu, %25 VS3 (1.625 M Gliserol + %1.5 PEG)

Bileşen	/8 ml	/20 ml	/40 ml
%100 VS3	2 ml	5 ml	10 ml
M2	6 ml	15 ml	30 ml

İkinci yöntemde ise, embriyolar ekilibrasyon için M2 vasatı içerisinde hazırlanmış %10 FCS ile desteklenmiş 2 M etilen glikol (EG) solüsyonu hazırlanmıştır. Vitrifikasyon işlemi içinse, M2 vasatı içerisinde hazırlanmış 7 M EG solüsyonu kullanılmıştır. Kullanılan solüsyonlar modifiye edildikten sonra kullanılmıştır (90). Kullanılan her iki solüsyona ait formülasyonlar değişik hacimler için Tablo 5 ve 6'da gösterilmiştir. İkinci yöntem, EG ile vitrifikasyon yöntemi diye adlandırılmıştır.

Her iki vitrifikasyon solüsyonunda kullanılan kriyoprotektanların uzaklaştırılması amacıyla da M2 içerisinde hazırlanan 1 M'lık sükröz solüsyonu kullanılmıştır (42). İlgili formülasyon Tablo 7'de değişik hacimler için verilmiştir. Hazırlanan bu solüsyon aşağıda

açıklandığı gibi hem payetlerin doldurulmasında hem de çözündürme sonrası payet içeriğinin boşaltıldığı ortamda kullanılmıştır.

**Tablo – 5** Ekilibrasyon Solüsyonu [2 M Etilen Glikol (EG) + %10 Fötal Buzağı Serumu (FCS)]

Bileşen	/10 ml	/25 ml	/50 ml
EG	1.12 ml	2.8 ml	5.6 ml
FCS	1 ml	2.5 ml	5 ml
M2	7.88 ml	19.7 ml	39.4 ml

**Tablo – 6** Vitrifikasyon Solüsyonu (7 M EG)

Bileşen	/10 ml	/25 ml	/50 ml
EG	3.9 ml	9.75 ml	19.5 ml
M2	6.1 ml	15.25 ml	30.5 ml

**Tablo – 7** Kriyoprotektanların uzaklaştırılmasında kullanılan solüsyon (1 M Sükkroz)

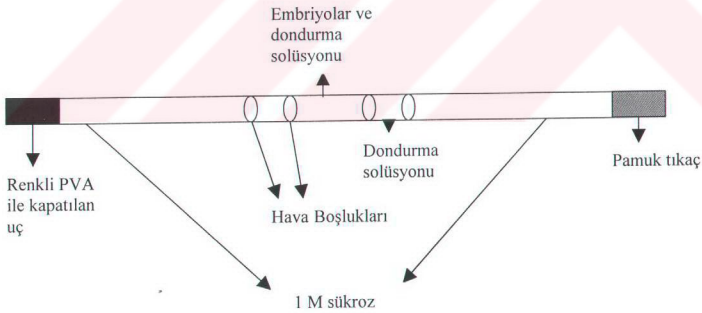
Bileşen	/10 ml	/25 ml	/50 ml
Sükkroz	3.423 gr	8.5575 gr	17.115 gr
M2	10 ml	25 ml	50 ml

### **Embriyoların Vitrifikasyon Yöntemiyle Dondurulması**

Deneylerin yapılacağı gün, vitrifikasyon işlemi için seçilen kaliteli morula ve blastosistler VS3 ve EG vitrifikasyon yöntemlerinde kullanılmak üzere iki gruba bölünmüştür.

VS3 solüsyonu ile embriyoların dondurulmasında, 100 mm'lik petri kutusu ortadan bir çizgi ile ikiye bölünmüştür. Bir taraf ekilibrasyon ve diğer taraf ise, vitrifikasyon için işaretlenmiştir. Daha sonra, 30'ar µl'lik ekilibrasyon ve dondurma solüsyonlarından oluşan damlalar bire bir eşit sayıda hazırlanmıştır. Ekilibrasyon damlası içerisine ortalama 10 embriyo (morula ya da blastosist) konarak oda ısısında ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) 10 dakika bekletilmiştir. Ekilibrasyon aşamasındaki bekleme sürecinin son 1-2 dakikasında 5 ml'lik enjektör ucuna

sabitlenmiş sarı pipet ucuna takılmış 0.25 ml'lik payet içerisine 1 M'lık sükröz solüsyonu payetin yaklaşık yarısına kadar çekilmiştir. Arada yaklaşık 0.5 cm'den daha küçük bir hava boşluğundan sonra çok az miktarda %100 VS3 solüsyonu çekilmiş ve ikinci bir hava boşluğu burada da bırakılmıştır. Ekilibrasyon aşamasından sonra, embriyolar dondurma solüsyonunu içeren damla içerisine aktarılmıştır. Embriyolar burada 30 saniye bekletildikten sonra, 30 µl'lik dondurma solüsyonu ile birlikte ekilibrasyon aşamasının sonuna doğru hazırlanmış payet içerisine çekilmiştir. Embriyoların bulunduğu kısımdan sonra hava boşluğu bırakılarak az miktarda %100 VS3 solüsyonu çekilerek hava boşluğu bırakılmış ve son olarak pamuk tıkalı uca üst taraftaki sükröz solüsyonunun temas ettiği ana kadar 1 M'lık sükröz solüsyonu çekilmiştir. Bu aşamadan sonra, payetler embriyonik döneme göre değişen 2 ayrı renkteki özel PVA, (morula-yeşil, blastosist-turuncu) ile kapatılarak payetlerin doldurulma işlemi tamamlanmıştır (Şekil 2). Kapatılan payet azot içerisinde yüzen strafor üzerine konularak azot buharında yaklaşık 1 dakika bekletildikten sonra, sıvı azot içerisine daldırılmıştır. Direkt daldırma işleminde payetlerin çoğunluğunda çatlama meydana geldiğinden bu yola gidilmiştir. Son olarak, sıvı azot içerisinde bulunan donmuş embriyoların bulunduğu payetler pensler aracılığı ile çözündürülünceye dek saklanmak üzere sıvı azot tankına transfer edilmiştir.

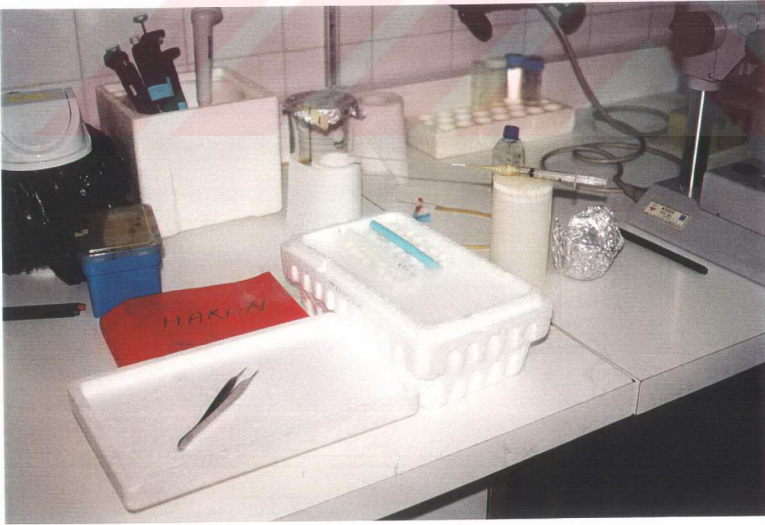


**Şekil – 2** Payetlerin doldurulması

EG ile dondurma yönteminde ise, 100 mm'lik petri kutusu ortadan bir çizgi ile aynı şekilde ikiye bölündükten sonra, 30'ar µl'lik ekilibrasyon ve dondurma solüsyonlarından bire bir karşılıklı eşit sayıda damlalar hazırlanmıştır. Ortalama 10 adet embriyo (morula ya da blastosist) M2 damlasından alınıp, ekilibrasyon damlası içerisine transfer edilerek oda



ısısında ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) 5 dakika süreyle bekletilmiştir. Daha sonra, embriyolar 7 M EG solüsyonunu içeren damla içerisine aktarılmış ve 2 dakika süreyle yine oda ısısında bekletilmişlerdir. Bu süreç içerisinde 0.25 ml'lik payet içerisine aynen yukarıda açıklandığı gibi sükröz, hava boşluğu ve 7 M EG solüsyonu çekilerek payet embriyoların transferi için hazır hale getirilmiştir. İki dakikalık süreç sonunda, embriyoları içeren 30  $\mu\text{l}$ 'lik solüsyon embriyolarla birlikte hazırlanmış payet içerisine çekilmiştir. Daha sonra, hava boşluğu, 7 M EG solüsyonu, hava boşluğu ve üst kısımdaki pamuk tıkaç bulunan kısma temas edinceye kadar 1 M'lık sükröz solüsyonu payet içerisine çekilmiştir. Daha sonra, payetlerin açık uçları, embriyonik döneme göre değişen 2 ayrı renkteki özel PVC (morula-kırmızı, blastosist-mavi) ile kapatılarak payetlerin doldurulma işlemi tamamlanmıştır (Şekil 2). Kapatılan payetler aynı şekilde azot içerisnde yüzen straför üzerine konularak azot buharında yaklaşık 1 dakika bekletildikten sonra, sıvı azot içerisine daldırılarak dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, sıvı azot içerisindeki donmuş embriyoların bulunduğu payetler sıvı azot içerisnde soğutulmuş bir pens yardımıyla sıvı azot tankına çözündürülünceye dek saklanmak üzere transfer edilmiştir. Embriyoların vitrifikasyonla dondurma işleminde kullanılan malzemeler Şekil 3'te görülmektedir.



Şekil – 3 Embriyoların vitrifikasyonla dondurulmasında kullanılan malzemeler

Her iki dondurma yönteminde de embriyoların M2'den ekilibasyon ve buradan da vitrifikasyon solüsyon damlalarına transferinde, damladan damlaya vasat veya vitrifikasyonda kullanılan solüsyonların mümkün olduğunca az transfer edilmesine özellikle dikkat edilmiştir. Bunun için, embriyo transfer pipeti ile hangi vasat veya solüsyona transfer yapılacaksa, işlemde önce o vasat veya solüsyon ile kapiller etkiden dolayı meydana gelen pipet içi vakum dengeleninceye kadar doldurulmuştur.

### **Embriyoların Çözündürülmesi**

Her iki yöntemle dondurulan embriyolar aynı şekilde çözündürülmüştür. Çözündürme işleminde, payetler sıvı azot tankından çıkarıldıktan 5-10 saniye sonra, direkt olarak 20°C'deki su içerisine bırakılmıştır. Payetler 15-20 saniye sonra alınarak kağıt havlu ile kurulandıktan sonra, kapatılan uç bir makasla kesilmiştir. Daha sonra, pamuk tıkaçın bulunduğu kısım da makasla kesilerek, içeriğin tümü 100 mm'lik bir petri kutusu içerisindeki 300 µl'lik 1 M'lık sükröz solüsyonu içeren damlalardan birisine boşaltılmıştır. Yaklaşık 5 dakika burada tutulan embriyolar alınarak M2 vasatı içerisine aktarılmış ve en az 3 kez M2 vasatı içerisinde iyi bir şekilde yıkanmıştır.

### **Çözündürme Sonrası Embriyoların Kültüre Edilmesi ve Değerlendirilmesi**

Yıkama sonrası, elde edilen embriyolar toplanarak kültür için ortalama 20-30 adet embriyo 50 µl'lik CZB vasatı içerisine aktarıldıktan sonra, %5 CO<sub>2</sub>, 37°C ve %95 dolayındaki yüksek neme sahip inkübatör içerisine transfer edilmiştir. Embriyolar 24 veya 48 saat süreyle kültür edilmiştir. Morula dönemindeki embriyolar kültüre başladıktan 48 saat sonra ve blastosist dönemindeki embriyolar ise, 24 saat sonra morfolojik olarak değerlendirilmiş ve kayıtları tutulmuştur. Morfolojik değerlendirmede, morulaların blastosiste gelişimleri temel alınmıştır. Blastosistlerde ise, bütünlük ve canlılıklarını koruyabilmelerine ve hacimce genişlemelerine bakılarak değerlendirme yapılmıştır (112).

## **Dondurma Solüsyonları İçin Toksikite Testleri**

Toksikite testleri dondurma solüsyonlarının embriyolar üzerindeki toksik etkilerinin ne derecede etkili olduğunu belirlemek amacıyla uygulanmıştır. Bunun için hem morula hem de blastosist dönemindeki embriyolar çalışmada kullanılan her iki dondurma protokolüne dondurma basamağı hariç aynı şekilde maruz bırakılmıştır. Sonrasında kriyoprotektan maddelerin uzaklaştırılması için uygulanan yöntem de aynı şekilde uygulanmış ve embriyolar yıkandıktan sonra, kültüre alınmışlardır. Ayrıca, kontrol grubu olarak da, direkt M2 yıkama vasatından embriyolar kültüre alınmıştır. Morfolojik değerlendirme morulalarda 48 saat sonra, blastosistlerde ise 24 saat sonra yapılmıştır. Değerlendirmede yukarıda açıklanan kriterler göz önüne alınmıştır.

## **Elde Edilen Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi**

Çalışmanın sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde  $\chi^2$  (ki-kare) testi (113) kullanılmıştır.

## BULGULAR

Vitrifikasyon ve solüsyonların toksisitelerini kontrol etmek için yapılan tüm denemelerde toplam 80 adet vaginal plak gösteren dişi fare kullanılmıştır. Bunlardan 37 tanesi 2.5 günlük gebe iken kullanılmış ve toplam 365 adet morula döneminde embriyo elde edilmiştir. Hayvan başına elde edilen ortalama embriyo sayısı ise 9.86 olarak gerçekleşmiştir. Geriye kalan 43 fare ise, 3.5 günlük gebe iken kullanılmış ve toplam 273 adet blastosist döneminde embriyo elde edilmiştir. Hayvan başına ortalama blastosist sayısı ise 6.34 olarak gerçekleşmiştir. Deneylerde kullanılan fare ve embriyo sayılarını gösteren ayrıntılı bilgiler morula ve blastosistler için ayrı ayrı verilmiştir (Tablo 8).

**Tablo – 8** Morula ve Blastosist Eldesinde Kullanılan Fare ve Elde Edilen Embriyo Sayıları

MORULA ELDESİ			BLASTOSİST ELDESİ		
Deney Tarihi	Kullanılan fare sayıları*	Elde edilen toplam morula sayısı (hayvan başına ortalama morula sayısı)	Deney Tarihi	Kullanılan fare sayıları*	Elde edilen toplam blastosist sayısı (hayvan başına ortalama blastosist sayısı)
10.04.2000	6	78 (13.00)	26.05.2000	8	43 (5.37)
28.04.2000	6	54 (9.00)	23.06.2000	6	65 (10.83)
01.06.2000	7	75 (10.71)	30.06.2000	10	23 (2.30)
22.06.2000	4	48 (12.00)	06.07.2000	7	40 (5.71)
29.06.2000	5	49 (9.80)	07.07.2000	5	42 (8.40)
29.08.2000	9	61 (6.77)	28.08.2000	7	60 (8.57)
<b>Toplam</b>	<b>37</b>	<b>365 (9.86)</b>	<b>Toplam</b>	<b>43</b>	<b>273 (6.34)</b>

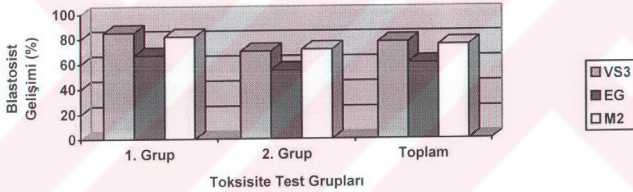
\* Süperovulasyon uygulanmış ve çiftleşme sonrasında vaginal plak gösteren fare sayıları.

Vitrifikasyon işleminde kullanılan solüsyonların morulalar üzerindeki toksik etkilerini test etmek için yapılan denemelerde VS3 solüsyonu için toplam 40 adet morula kullanılmış ve bunlardan yapılan 48 saatlik kültür sonucunda 31 adeti (%77.50) blastosist dönemine gelişmiştir. EG solüsyonu içinse toplam 38 adet morula kullanılmış ve bunlardan 23 adeti (%60.52) 48 saatlik kültür sonucunda blastosist dönemine ulaşmıştır. Kontrol olarak kullanılan gruplarda ise toplam 32 adet morula, diğer gruplarda işlem

yapılırken, M2 yıkama vasatı içerisinde bekletildikten sonra 48 saat kültüre edilmiş ve bunlardan 24 adeti (%75.00) blastosist aşamasına ulaşmıştır. Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Morulalar için yapılan toksisite testlerine ilişkin ayrıntılı bilgiler Tablo.9 ve Şekil 4'te verilmiştir.

**Tablo – 9** Morula Toksikite Test Sonuçları

Grup no	Embriyoların maruz bırakıldığı solüsyonlar	Kullanılan morula sayısı	~48 saat sonra blastosist sayıları (%)
1	VS3	20	17 (%85.00)
	EG	18	12 (%66.66)
	M2	11	9 (%81.81)
2	VS3	20	14 (%70.00)
	EG	20	11 (%55.00)
	M2	21	15 (%71.42)
<b>Toplam</b>	VS3	40	31 (%77.50)
	EG	38	23 (%60.52)
	M2	32	24 (%75.00)



**Şekil – 4** Morula toksisite test uygulamasından 48 saat sonra yapılan değerlendirme sonucu elde edilen blastosist gelişim oranları (%)

Vitrifikasyonda kullanılan solüsyonların blastosistler üzerindeki toksik etkilerini saptamak için yapılan denemelerde ise, VS3 solüsyonu için toplam 38 adet blastosist kullanılmış ve 24 saatlik kültür sonucunda bunlardan sadece 10 tanesi (%26.31) normal blastosist formlarını kazanmışlardır. EG solüsyonu içinse, 22 adet blastosist kullanılmış ve bunlardan 15 adeti (%68.18) normal blastosist formlarını kazanmışlardır. Kontrol grubunda yer alan ve M2 ile işlem gören 20 adet blastosistin tümü (%100) normal şekillerini hiç kaybetmemiş ve gelişmelerine devam etmiştir. Yapılan istatistiksel

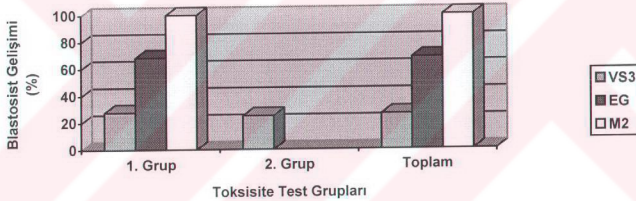
değerlendirme sonucunda gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Blastosist toksisite testlerine ilişkin ayrıntılı bilgiler Tablo 10 ve Şekil 5'te verilmiştir.

**Tablo – 10** Blastosist Toksikite Test Sonuçları

Grup no	Embriyoların maruz bırakıldığı solüsyonlar	Kullanılan blastosist sayısı	~24 saat sonra blastosist sayıları (%)
1	VS3	18	5 (%27.77)
	EG	22	15 (%68.18)
	M2	20	20 (%100.00)
2*	VS3	20	5 (%25.00)
	EG	-	-
	M2	-	-
<b>Toplam</b>	VS3	38	10 (%26.31) <sup>a</sup>
	EG	22	15 (%68.18) <sup>b</sup>
	M2	20	20 (%100.00) <sup>c</sup>

\* 1. gruptaki blastosistlerin elde edildiği gün elde edilen kompakt morulardan gelişen blastosistler 1 gün sonra kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

a-c: Aynı sütunda değişik harflerle gösterilen grup yüzdeleri arasındaki farklar önemlidir ( $P<0.01$ ).



**Şekil – 5** Blastosist toksisite test uygulamasından 24 saat sonra yapılan değerlendirme sonucu canlılığını koruyabilen blastosist oranları (%)

Vitrifikasyon yöntemiyle morula dönemindeki embriyoların dondurulmasında toplam 122 adet morula VS3 için ve 123 adet morula ise EG için kullanılmıştır. Dondurma ve çözündürme işlemleri boyunca bazı embriyolar kaybedilmiş ve geriye kalan VS3 grubundan 112 ve EG grubundan 107 adet morula kültüre alınmıştır. Kültürden yaklaşık 48 saat sonra yapılan değerlendirmede VS3 grubundaki embriyoların %71.42'si (80/112) blastosist dönemine dek gelişimlerini sürdürmüştür. EG grubundaki embriyolardan ise %28.97'si (31/107) blastosist evresine dek gelişmiştir. Morula dönemindeki embriyoların dondurulması ile ilgili deneme gruplarına ilişkin ayrıntılı bilgiler Tablo 11 ve Şekil 6'da

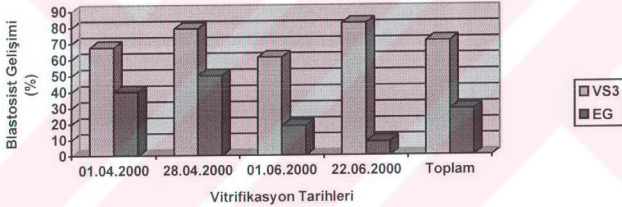
verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0.001$ ).

**Tablo – 11** Morula Dönemindeki Embriyoların Vitrifikasyon Yöntemiyle Dondurulması ve Çözündürme Sonrası Elde Edilen Sonuçlar

Dondurma tarihi	VS3'te dondurulan embriyo sayısı	EG'de dondurulan embriyo sayısı	Çözündürme tarihi	VS3'ten kültüre alınan embriyo sayısı	EG'den kültüre alınan embriyo sayısı	48 saat sonra yapılan morfolojik değerlendirme			
						VS3		EG	
						n	%	n	%
10.04.2000	40	38	11.04.2000	34	30	23	67.64	12	40.00
28.04.2000	27	27	12.07.2000	24	22	19	79.16	11	50.00
01.06.2000	31	34	12.07.2000	31	32	19	61.29	6	18.75
22.06.2000	24	24	12.07.2000	23	23	19	82.60	2	8.69
<b>Toplam</b>	<b>122</b>	<b>123</b>		<b>112</b>	<b>107</b>	<b>80</b>	<b>71.42<sup>a</sup></b>	<b>31</b>	<b>28.97<sup>b</sup></b>

n= 48 saatlik kültür sonrasında sayılan blastosit sayısı.

a,b: Aynı satırda değişik harfler ile gösterilen grup yüzdeleri arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.001$ ).



**Şekil - 6** Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmuş morula dönemindeki embriyolardan çözündürme sonrası gelişen blastosit oranları (%)

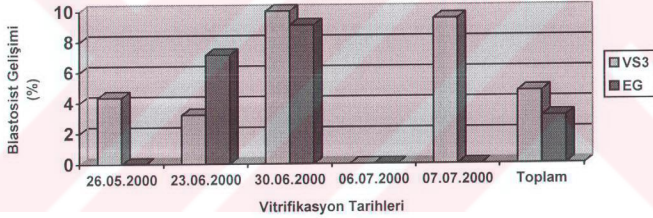
Blastositlerin vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmasında ise, toplam 110 blastosit VS3 için ve 103 blastosit de EG için kullanılmıştır. Her iki gruptan da bazı embriyolar dondurma ve çözündürme işlemleri boyunca kaybedilmiştir. Çözündürme sonrası blastositlerin tümünde kollaps gözlenmiştir. VS3 ve EG gruplarından sırasıyla 105 ve 96 adet blastosit çözündürme sonrası kültür edilmiştir. Bunlardan da sırasıyla, 5 (%4.76) ve 3 (%3.12) tanesi canlılıklarını koruyarak tekrar blastosöl boşluğuna sahip normal blastosit formuna geçmiştir. Blastosit vitrifikasyonuna ilişkin deney grupları ile ilgili ayrıntılı bilgiler Tablo 12 ve Şekil 7'de gösterilmiştir. Yirmi dört saat sonra yapılan morfolojik

değerlendirme sonuçlarına göre toplam blastosist aşamasına ulaşan embriyo yüzdeleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).

**Tablo – 12** Blastosist Dönemindeki Embriyoların Vitrifikasyon Yöntemiyle Dondurulması ve Çözündürme Sonrası Elde Edilen Sonuçlar

Dondurma tarihi	VS3'te dondurulan embriyo sayısı	EG'de dondurulan embriyo sayısı	Çözündürme tarihi	VS3'ten kültüre alınan embriyo sayısı	EG'den kültüre alınan embriyo sayısı	24 saat sonra yapılan morfolojik değerlendirme			
						VS3		EG	
						n	%	n	%
26.05.2000	24	19	13.07.2000	23	19	1	4.34	0	0.00
23.06.2000	35	30	13.07.2000	31	28	1	3.22	2	7.14
30.06.2000	10	13	13.07.2000	10	11	1	10.00	1	9.09
06.07.2000	20	20	13.07.2000	20	18	0	0.00	0	0.00
07.07.2000	21	21	13.07.2000	21	20	2	9.52	0	0.00
<b>Toplam</b>	<b>110</b>	<b>103</b>		<b>105</b>	<b>96</b>	<b>5</b>	<b>4.76</b>	<b>3</b>	<b>3.12</b>

n= 24 saatlik kültür sonrasında sayılan blastosist sayısı.



**Şekil - 7** Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmuş blastosist dönemindeki embriyolardan çözündürme sonrası canlılıklarını koruyan blastosist oranları (%)



## TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada morula ve blastosist aşamasındaki hibrit fare embriyoları %25 VS3 ve 2 M EG + %10 FCS solüsyonları içerisinde sırasıyla 10 ve 5 dakika süreyle oda ısısında ekilibre edilmiştir. Ekilibrasyon sonrası embriyolar %100 VS3 ve 7 M EG vitrifikasyon solüsyonları içerisinde sırasıyla 30 saniye ve 2 dakika bekletildikten sonra, 0.25 ml'lik payetler içerisinde vitrifiye edilmiştir. Morula dönemindeki embriyoların eldesi için toplam 37 adet 2.5 günlük gebe hibrit fare kullanılmış ve toplam 365 adet embriyo elde edilmiştir. Hayvan başına elde edilen ortalama morula sayısı da 9.86 olarak bulunmuştur. Blastosist eldesinde ise, toplam 43 adet 3.5 günlük hibrit fare kullanılmış ve bunlardan toplam 273 adet blastosist elde edilmiştir. Hayvan başına elde edilen ortalama blastosist sayısı ise 6.34 olmuştur (Tablo 8). Sunulan çalışmada gelişim dönemi ilerledikçe, elde edilen embriyo sayısının da azaldığı gözlenmiştir. Bu durumun beklenen bir durum olduğu ifade edilmektedir (108).

Vitrifikasyonla embriyo dondurma çalışmalarında, embriyolar vitrifikasyon işleminden önce hücre içerisine nüfuz edebilen EG, gliserol, DMSO ve propilen glikol gibi bir kriyoprotektan ya da bu kriyoprotektanların değişik karışımlarının yüksek konsantrasyonlarına maruz bırakılarak dehidre edilmektedir (3, 71). Kriyoprotektanlara karşı hücrelerin geçirgenliği kriyoprotektan maddenin türüne ve konsantrasyonuna, işlemlerin uygulandığı sıcaklık derecelerine ve solüsyonlara maruz bırakılma sürelerini de içeren bazı faktörlere bağımlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (3, 64, 114, 115).

Etilen glikolün dondurulan embriyolar için düşük düzeyde toksik etkiye sahip olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (34, 116-118). Ancak, solüsyonlar içerisinde bekletme süresinin kısa tutulmasının da büyük önem taşıdığı bildirilmiştir (118).

Vitrifikasyonda kullanılan solüsyonların embriyolar üzerindeki toksik etkilerini araştırmak için yapılan toksisite testlerinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde; morula dönemindeki embriyoların toksisite test uygulamasından sonra, blastosist dönemine gelişim oranları VS3 için %77.50, EG için %60.52 ve M2 için %75.00 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirmede ise, gruplar arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Toksisite test sonuçlarından hareketle vitrifikasyon solüsyonlarının morula dönemindeki embriyolar üzerinde önemli bir toksik etki oluşturmadığı sonucu çıkarılabilir. Blastosist dönemindeki embriyolar için yapılan toksisite testlerinden elde edilen sonuçlar ise, VS3 için %26.31, EG için %68.18 ve M2 için %100 bulunmuştur. Gruplar arasındaki farklar

ise istatistiksel değerlendirme sonucunda önemli bulunmuştur ( $P < 0.01$ ). Blastosist toksisite test uygulamalarında morfolojik değerlendirme blastosist dönemindeki embriyoların bütünlüklerini koruyup korumadıklarına bakılarak yapıldığından, M2 grubu içerisinde yer alan embriyoların gelişim oranı %100 bulunmuştur. Blastosist dönemindeki embriyolar üzerinde yapılan toksisite test sonuçları, kullanılan vitrifikasyon solüsyonlarının embriyolar üzerinde toksik etki oluşturduğunu göstermektedir. Özellikle, %100 VS3 solüsyonu blastosist aşamasındaki embriyolar üzerinde önemli zararlar oluşturmuştur.

Sommerfield ve Neimann (117), yaptıkları çalışmada 7, 8 ve 9 günlük sığır blastosistlerini 10'ar dakika süre ile 1.8, 3.6, 5.4, 7.2 ve 8.9 M EG içeren solüsyonlar içerisinde bekletmişlerdir. Elde edilen sonuçlar 7, 8 ve 9 günlük blastosistler için sırasıyla %89.5, 98.0, 63.4, 15.6 ve 0.0; %74.8, 68.7, 64.4, 9.0 ve 0.0; %54.2, 69.8, 43.8, 8.3 ve 0.0 olarak bildirilmiştir. Sonuçlar arasında yapılan karşılaştırma sonucunda, yüksek konsantrasyonlardaki EG solüsyonların embriyolar üzerinde toksik etki gösterdiği sonucu çıkarılmıştır. Burada dikkat edilmesi gereken konu 10 dakikalık sürenin normalde yoğun konsantrasyonlardaki solüsyonların kullandığı vitrifikasyon protokolleri için oldukça uzun olduğudur.

Embriyonik gelişim dönemleri açısından çalışmada kullanılan vitrifikasyon yöntemleri karşılaştırıldığında, morula dönemindeki embriyoların çözündürme sonrası gelişim oranları, blastosist dönemindeki embriyolarinkine göre daha üstün bulunmuştur. Cseh ve arkadaşları (16) tarafından fareler üzerinde yapılan çalışmada da, kompakt morulaların vitrifikasyona karşı erken ve genişlemiş blastosistlerden daha toleranslı oldukları bildirilmiştir. Anılan çalışmada 2 farklı vitrifikasyon yöntemi kullanılmıştır. Bunlardan biri sunulan çalışmada da kullanılan VS3 yöntemi ile aynı iken, diğeri %10 gliserol + %20 propilen glikol içeren ekilibrasyon ve %25 gliserol + %25 propilen glikol içeren vitrifikasyon solüsyonlarının kullandığı yöntemdir. Bildirilen çalışmada ekilibrasyon işlemi oda ısısında gerçekleştirildiğinde gelişim oranı %93 olarak bildirilirken, ekilibrasyon işlemi 4°C'de gerçekleştirildiğinde ise gelişim oranı %83 olarak bildirilmiştir. Sunulan çalışmadaysa gelişim oranı oda ısısında gerçekleştirilen ekilibrasyondan sonra yukarıda bildirilen her iki gruptan daha düşük bulunmuştur. Ancak morula toksisite testi için kullanılan kontrol grubundaki morulaların da gelişim oranlarının ortalama %75 olduğu göz önüne alınırsa sunulan çalışmada elde edilen sonuçların, yukarıda bildirilen sonuçlardan düşük olmasına karşın, kontrol grubu ile gösterdiği paralellik göz önüne alınırsa sonucun iyi olduğu söylenebilir. Bu durum, seçilen

embriyoların normal kültür şartlarında da çok yüksek oranda blastosiste gelişmemesi, kalite yönünden en iyi embriyolardan başka diğer embriyoların da kullanılmış olma olasılığı veya laboratuardaki kültür şartlarının gelişim oranına negatif etkili olduğu şeklinde açıklanabilir. Aynı çalışmada blastosist dönemindeki embriyoların gelişim oranları sırasıyla oda ısısında ve 4°C'de ekilibrazyondan sonra sırasıyla %6 ve %5 olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlar, sunulan çalışmada VS3 vitrifikasyon solüsyonu ile elde edilen sonuçla (%4.76) benzerlik göstermektedir.

Farelerde yapılan başka bir çalışmada (21) ise, dişi farelerden elde edilen zigot aşamasındaki embriyolar HTF (human tubal fluid) vasatı içerisinde *in vitro* kültüre edilmiş ve gelişen embriyolar 2 hücre, 4-8 hücre, kompakt morula, erken blastosist, genişleyen blastosist ve genişlemiş blastosist aşamasında iken hızlı dondurma yöntemiyile dondurulmuşlardır. Dondurma işleminde kullanılan solüsyon %10 FBS (fötal sığır serumu) + 0.25 M sükröz + 3 M etilen glikol içeren DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) solüsyonudur. Bildirilen çalışmada elde edilen sonuçlar embriyonik dönemlere göre sırasıyla, 2 hücre için %51, 4-8 hücre için %47, kompakt morula ve erken blastosistler için %80 ve genişleyen ve genişlemiş blastosistler için %17'dir. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında, kompakt morula ve erken blastosist dönemindeki embriyoların hızlı dondurma protokolü için en ideal grubu oluşturduğu görülmektedir. Morula ve blastosist dönemleri dikkate alındığında, sunulan çalışma ile anılan çalışma arasında morula dönemindeki embriyolardan daha iyi sonuç alınması bakımından benzerlik bulunmaktadır. Kompakt morula ve erken blastosist dönemindeki embriyolardan elde edilen sonuç, sunulan çalışmada VS3 ile dondurulan morula dönemindeki embriyolardan elde edilen sonuca (%71.42) benzerlik göstermekte iken, 7 M EG ile vitrifiye edilen morularının gelişim oranı sunulan çalışmada oldukça düşük (%28.97) gerçekleşmiştir. Buna sebep olarak EG ile vitrifikasyonda sükröz gibi diğer bir ikinci kriyoprotektan maddenin (genellikle makromolekül ve şekerlerin) kullanılmamış olması gösterilebilir (33, 57, 119-121). Vitrifikasyon yöntemi ile dondurma işlemlerinde genellikle en az iki adet farklı kriyoprotektanın kullanılması özellikle önerilmektedir (3, 34, 42, 54, 57, 122). Sunulan çalışmada blastosist dönemindeki embriyoların vitrifikasyonundan elde edilen sonuçlar (VS3 için %4.76, EG için %3.12) yukarıda anılan çalışmada (21) blastosistler için bildirilen sonuçtan (%17) daha düşük gerçekleşmiştir.

Naitana ve arkadaşları (123) koyunlarda yaptıkları bir çalışmada morula, kompakt morula ve blastosist aşamasındaki embriyoların biyopsi işleminden sonra vitrifikasyon yöntemiyle dondurmışlardır. Vitrifikasyon işlemi için kullanılan tüm solüsyonlar 0.3 mM

sodyum piruvat, 3.3 mM glikoz ve %20 FCS ile desteklenmiş PBS içerisinde hazırlanmış ve işlemin tüm aşamaları oda ısısında gerçekleştirilmiştir. Ekilibasyon için embriyolar beşer dakika süreyle sırasıyla 1.4 M gliserol ve 1.4 M gliserol + 3.6 M EG solüsyonlarında bekletildikten sonra, 3.4 M gliserol + 4.6 M EG içeren solüsyon içerisinde vitrifiye edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, morula ve kompakt morulaların biyopsi (embriyonik düzeyde iken prenatal tanı ya da cinsiyetin belirlenmesi için embriyolardan bir kısım blastomerin uzaklaştırılması) işlemi uygulandıktan sonra vitrifikasyon yöntemi ile donduruldukları zaman blastosist dönemindekilere göre daha duyarlı oldukları bildirilmiştir. Yine koyunlarda yapılan başka bir çalışmada (124) morula ve blastosist dönemindeki embriyolar 3.4 M gliserol + 4.6 M EG içeren ve %20 FCS ya da %0.1 PVA ile takviye edilen iki ayrı vitrifikasyon solüsyonu içerisinde dondurulmuştur. Çalışmanın sonucunda PVA'nın FCS yerine kullanılabilmesi ve vitrifikasyon yöntemiyle dondurma işleminde blastosist dönemindeki embriyoların morula dönemindeki embriyolara göre daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir.

Pugh ve arkadaşları (45), sığırlarda yaptıkları çalışmada 1.5 M gliserol içeren dondurma solüsyonunu kullanarak embriyoları yavaş dondurma yöntemi ile dondurmuşlardır. Yapılan çalışmada kompakt morula ve erken blastosist dönemindeki embriyolar, blastosistler ve zona pellusidadan dışarı çıkmış blastosistler dondurulmuştur. Çözündürme sonrası canlılıklarını koruyan ve gelişimini sürdüren embriyoların oranları sırasıyla %50.6, %58.7 ve %70.5 bulunmuştur. Koyun ve sığırlarda bildirilen yukarıdaki çalışmaların sonuçları, sunulan çalışmadan elde edilen sonuçların tersine blastosist dönemindeki embriyoların dondurma ve çözündürme işlemlerine karşı daha toleranslı olduğunu göstermektedir.

Berthelot ve arkadaşları (7) ise, iki farklı domuz ırkından elde ettikleri morula ve blastosist dönemindeki embriyoları iki farklı ana solüsyon (TCM ve PBS) içerisinde hazırladıkları dondurma solüsyonları içerisinde OPS yöntemiyle vitrifiye etmişler ve sonrasında gruplar arasında karşılaştırma yapmışlardır. Anılan çalışmada vitrifikasyon için DMSO + EG + süroz karışımı kullanılmıştır. Vitrifikasyonla dondurma işleminde blastosist dönemindeki embriyoların morulalardan daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Bildirilen bu çalışmanın sonuçları da sunulan çalışmanın sonuçlarından farklı şekilde blastosistler lehine olmuştur.

Japonya'da yapılan bir çalışmada (29) ise, kompakt morula, erken blastosist, blastosist ve genişlemiş blastosist dönemindeki sığır embriyoları EG, propilen glükol ya da gliserol içerisinde yavaş dondurma yöntemiyle dondurulmuş ve çözündürme sonrası

embriyolar direkt olarak transfer edilmiştir. Transferlerden elde edilen gebelik oranları kompakt morula, erken blastosist, blastosist ve genişlemiş blastosistler için sırasıyla %47.1 (131/278), %49.6 (187/377), %37.6 (160/425) ve %34.7 (67/193) olarak bildirilmiştir. Gebelik oranlarından anlaşıldığı üzere, kompakt morula ve erken blastosist döneminde dondurulup çözündürülen embriyolardan blastosist ve genişlemiş blastosist döneminde dondurulup çözündürülen embriyolara oranla daha iyi sonuç alındığı görülmektedir. Bu sonuç, sunulan çalışmadan elde edilen sonuçlar ile kısmen benzerlik göstermektedir. Dolayısı ile, anılan çalışmadan elde edilen sonuca göre, dondurulup çözündürülmüş morula ve erken blastosist dönemindeki embriyoların direkt transferlerinin uygulama açısından daha avantajlı olduğu görülmektedir.

Morula ve blastosist aşamasındaki sığır embriyolarının 1.8 M EG, 1.8 M EG + 0.25 M sükröz ve kontrol olarak 1.4 M gliserol + 0.25 M sükröz dondurma solüsyonlarında dondurulduğu bir çalışmada (125), embriyolar çözündürüldükten sonra uygun taşıyıcılara transfer edilmiştir. Çalışmanın sonucunda gebelik oranları arasındaki farkların her üç grup açısından önemsiz olduğu görülmüştür. Ayrıca, embriyonik gelişim dönemlerinin kullanılan üç ayrı dondurma protokolü açısından önemli bir fark yaratmadığı ve EG'ün yavaş dondurma yönteminde tek başına başarı ile kullanılabilceği bildirilmiştir. Sunulan çalışmada ise, morulalar vitrifikasyon yöntemiyle dondurma için daha avantajlı bulunmuş fakat çözündürme sonrası transfer işlemi gerçekleştirilmemiştir.

In vitro üretilmiş sığır embriyoları ile yapılan çalışmada (33), 7 günlük kompakt morula ve blastosist dönemdeki embriyolar üç ayrı vitrifikasyon solüsyonunda (%40 EG, %25 EG + %25 DMSO ve %20 EG + %20 DMSO + %10 1,3-bütanediol) vitrifiye edilmiştir. Elde edilen sonuçlar sunulan çalışmanın sonuçlarından farklı bulunmuştur. Anılan çalışmadan elde edilen sonuçlar (çözündürme sonrası canlı kalma oranı kompakt morulalar için %24 ve blastosistler için %75) sunulan çalışmanın sonuçlarından farklı bulunmuştur. Sunulan çalışmanın aksine, anılan çalışmada, blastosist dönemindeki embriyoların çözündürme sonrası canlılıklarını ve gelişimlerini sürdürme oranları bakımından morula dönemindeki embriyolara göre daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir.

Ishimori ve arkadaşları (126) morula ve blastosist dönemindeki fare embriyolarını altı farklı vitrifikasyon solüsyonu içerisinde dondurmuşlardır. Kullanılan vitrifikasyon solüsyonlarının tümü iki farklı kriyoprotektan maddeden oluşmuştur ve solüsyonların tümü PBS içerisinde hazırlanmıştır. Bunlar; gliserol + EG, gliserol + propilen glikol (PG), gliserol + DMSO, EG + PG, EG + DMSO ve PG + DMSO ikililerinden oluşmuştur. Çözündürme sonrası morulalardan elde edilen sonuçlar sırasıyla %51, 16, 78, 44, 79, 50

iken, blastosistlerden elde edilen sonuçlar %72, 29, 55, 46, 79, 46 bulunmuştur. Bildirilen bu çalışmada gliserol + EG ve EG + DMSO kombinasyonlarından elde edilen sonuçlar diğer kombinasyonlardan önemli derecede daha üstün bulunmuştur ( $P<0.5$ ). Bunlardan da özellikle hem morula hem de blastosistler için %79'luk gelişim oranıyla EG + DMSO'in en iyi kombinasyon olduğu görülmektedir. Sunulan çalışmadan farklı olarak her iki dönemdeki embriyoların dondurma ve çözündürme sonrası gelişim oranları birbirinden farksız bulunmuştur. Oysa, sunulan çalışmada morulalar bu açıdan önemli derecede daha avantajlı bulunmuştur.

Sığırlarda fertilizasyon gününün sıfırncı gün kabul edildiği bir çalışmada (79) 1. günden 7. güne dek tüm gelişim dönemlerinden embriyolar OPS (open pulled straw) yöntemi ile vitrifiye edilmiştir. Her bir grup için vitrifiye edilmeden kültüre alınan embriyolar kontrol grupları olarak kullanılmıştır. Vitrifiye edilen ve kontrol gruplarında yer alan embriyoların gelişimlerinde istatistiksel fark sadece 1. ve 2. günde vitrifiye edilen dondurma gruplarında bulunmuştur. Diğer günlerde vitrifiye edilen ve kontrol olarak kullanılan embriyolar arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Normalde 5. gün elde edilen embriyolar morula dönemindeki embriyolarken, 6. gün elde edilenler erken blastosist ve 7. gün elde edilenler blastosist dönemindeki embriyolardır (127). Dolayısıyla bildirilen çalışmadan elde edilen sonuçlar, sunulan çalışmadan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında; morula dönemi için VS3'le elde edilen sonuçla bir benzerlik gözlenirken, EG ile elde edilen sonuç düşük olmuştur. Blastosist dönemindeki embriyolar açısından ise, sunulan çalışmada elde edilen sonuçların her ikisi bildirilen çalışma sonuçlarından çok düşük bulunmuştur.

Morulalar arasında yapılan karşılaştırmada, sunulan çalışmada VS3 vitrifikasyon solüsyonu ile dondurulmuş embriyolardan, EG vitrifikasyon solüsyonu ile dondurulmuş olanlara oranla daha iyi sonuç alınmıştır (%71.42'ye karşı %28.97). Geleneksel, hızlı dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri ile fare morulalarının dondurulduğu bir çalışmada çözündürme sonrası gelişim oranları karşılaştırılmıştır (128). Vitrifikasyon işlemi, embriyoların 3 dakika süre ile %20 EG solüsyonunda ekilibre edilmesini takiben, %40 EG + %18 fikal + %10.26 sükröz içeren solüsyonda 60 saniye bekletilmelerinden sonra, 0.25 ml'lik payetler içerisinde sıvı azota daldırılmalarıyla gerçekleştirilmiştir. Vitrifikasyondan sonra elde edilen gelişim oranı %84.54 iken bu oran dondurulmadan direkt kültüre alınmış kontrol grubunda %91.74 olarak gerçekleşmiştir. Sunulan çalışmada ise, VS3 vitrifikasyon yönteminden elde edilen sonuç bildirilen çalışmanın sonucuna benzerlik

gösterirken, özellikle EG ile vitrifikasyon yönteminden elde edilen sonuç bildirilen çalışma sonucundan oldukça düşük bulunmuştur.

Nowshari ve Brem (88), normalde embriyo dondurma solüsyonlarında yaygın olarak kullanılan serum ve BSA gibi biyolojik ürünlerin yerine kimyasal olarak tanımlanmış makromolekül olan PVA'nın kullanılıp kullanılmayacağını süperovulasyon uygulanmış farelerden elde edilen morula dönemindeki embriyoları dondurarak saptamaya çalışmışlardır. Dondurma işleminde kullanılan solüsyonlar M2 vasatı içerisinde hazırlanmış ve kullanımdan önce ayrıca %10 FCS, 0.1 mg/ml PVA veya %10 FCS + 0.1 mg/ml PVA ile desteklenmişlerdir. Ekilibrasyon için embriyolar 1.5 M EG + 0.25 M sükröz içeren solüsyon içerisinde oda ısısında 5 dakika süre ile bekletilmiştir. Daha sonra, embriyolar ağır pipeti aracılığıyla, 0.25 ml'lik payetin orta kısmında bulunan 50 µl'lik 7 M EG + 0.5 M sükröz solüsyonunun içerisine aktarılıp, payetin uç kısmı ısı ile kapatıldıktan sonra, toplam 40-60 saniye içerisinde sıvı azota daldırılarak dondurulmuştur. FCS, PVA ya da her ikisinin karışımı ile desteklenen solüsyonların kullanılması, çözündürme sonrası canlılık ve gelişim oranlarını değiştirmemiştir. Her üç grup için de gelişim oranları %80'nin üzerinde bulunmuştur. Bu değer, sunulan çalışmadan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, VS3 ile elde edilen sonucun anılan çalışmadakine yakın olduğu ve EG grubunun düşük olduğu gözlenmektedir. EG ile elde edilen sonucun düşük olmasının olası sebepleri ise, önceden de değinildiği gibi EG'nin hiçbir makromolekül, şeker ya da FCS gibi biyolojik maddelerle kombine edilmemesi veya vitrifikasyon solüsyonu içerisindeki bekleme süresinin (iki dakika) uzun olması olarak gösterilebilir. Ayrıca, EG ile dondurulan morula dönemindeki embriyo grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar arasında gözlenen önemli farklılıkların (olası sebebinin) dondurma tarihlerindeki farklılıktan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Nisan ayı içerisinde dondurulan iki grup embriyodan elde edilen sonuçlar ile Haziran ayı içerisinde dondurulan iki grup embriyodan elde edilen sonuçlardan çok daha yüksek oranda başarılı sonuç elde edilmiştir. Aradaki zaman dilimi oda sıcaklığında önemli değişikliklere sebep olduğundan; özellikle, artan oda sıcaklığının morula dönemindeki embriyoların dondurma işleminde çeşitli zararlara sebep olduğu söylenebilir.

Fare morulaları ile yapılan bir dondurma çalışmasında (129), embriyolar %5 gliserol, %5 gliserol + %0.3 BSA, %5 gliserol + %0.1 SH (sodyum hyaluronate) ve %5 gliserol + %0.05 ETS (Pluronic F-68) içeren dondurma solüsyonları içerisinde yavaş dondurma yöntemi ile dondurulmuştur. Çözündürmeden sonra kültüre edilen embriyolarda 48 saat sonra gözlenen gelişim oranları sırasıyla %47.2, 66.1, 60.3 ve 62.9 olarak

bildirilmiştir. Bu 4 grup arasında sadece %5 gliserolün tek başına kullanıldığı grup diğerlerinden farklı olarak daha düşük gelişim oranı sergilemiştir. Sunulan çalışma ile karşılaştırıldığında VS3 ile elde edilen sonuç bildirilen sonuçlardan iyi olmasına karşın, özellikle %5 gliserolün tek başına kullanıldığı grupta bu fark daha belirgin olmuştur. Materyal ve metot bölümünde belirtildiği gibi VS3 solüsyonu 6.5 M gliserol + %6 PEG içermektedir. Yapılan bir çalışmada (122), PEG'ün embriyoların vitrifikasyonu işleminde EG ile başarılı şekilde kombine edilebileceği ve kullanılabilirliği belirtilmiştir. Sunulan çalışmada EG tek başına kullanılmış ve elde edilen sonuç, yukarıda anılan çalışmadaki (129) grupların tümünden elde edilen sonuçlardan daha düşük gelişim oranı sergilemiştir.

Aksoy ve arkadaşları (23) tarafından farelerde yapılan bir çalışmada 1, 2, 3-4, 5-8 hücre ve kontrol olarak morula aşamasındaki embriyolar elde edildikten sonra, *in vitro* kültüre edilmişler ve morula aşamasına ulaştıklarında hızlı dondurma yöntemiyle dondurulmuşlardır. Çözündürme sonrası blastosiste gelişim oranları yukarıda yazılı sıraya göre %55.5, 84.9, 87.4, 90.1 ve 90.8 olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak embriyoların elde edildikleri gelişim dönemlerinin, özellikle 2 hücreli dönemde gelişimsel blok (two-cell block) gözlenen fare hatlarında, dondurma-çözündürme sonrası gelişimi etkilediği bildirilmiştir. Bir hücre döneminden gelişen morula grubu hariç, bildirilen çalışma sonuçları sunulan çalışma sonuçlarından daha üstün bulunmuştur. Ancak bir hücre döneminden gelişen morulalardan elde edilen sonuç sunulan çalışmadaki EG grubundan elde edilen sonuçtan daha yüksek iken, VS3 grubundan elde edilen sonuçtan daha düşük gelişim oranı sergilemiştir.

Desai ve arkadaşları (130) *in vivo* elde edilmiş fare zigotlarını  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$  modified Minimum Essential Medium) içerisinde morula aşamasına kadar kültüre etmiş ve bunları  $\alpha$ -MEM içerisinde hazırladıkları %5 gliserol ilave edilmiş solüsyonda 10 dakika süreyle ekilibre etmişlerdir. Ekilibrasyondan sonra, yine 10 dakika süreyle %9 gliserol + 0.2 M sükröz içeren  $\alpha$ -MEM solüsyonu içerisinde belettikten sonra embriyolar kryoviallerin (Nunc marka) içerisine aktararak yavaş dondurma yöntemi ile dondurulmuştur. Çözündürme sonrası canlılıklarını sürdüren embriyoların oranı %84 olarak bildirilirken, bunların kültüre edilmesinden sonraki ilk 8 saat sonunda erken blastosist dönemine ulaşan embriyoların oranı ise %70-80 arasında bildirilmiştir. Sunulan çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında VS3 ile elde edilen sonuçla benzerlik gözlenirken EG grubundan elde edilen sonuç daha düşük bulunmuştur.



Fare morularının vitrifiye edildiği bir çalışmada (131), AFP'nin vitrifikasyon işlemi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Embriyolar 3.5 M EG + 3.5 M gliserol içeren ve VS11 diye adlandırılan solüsyon içerisinde vitrifiye edilmiştir. Çalışmada VS11 ile dondurulan embriyoların 48 saat sonraki gelişim oranı %72.5 olarak bildirilmiştir. Bu sonuç sunulan çalışmadaki VS3 grubundan elde edilen sonuç ile benzerlik gösterirken, EG grubundan elde edilen sonuçtan daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, AFP'nin kullanıldığı grupta bu oran %61.2 olarak bildirilmiş ve AFP'nin morula dönemindeki fare embriyolarının dondurulması üzerinde yararlı bir etkisinin olmadığı ifade edilmiştir. Bu sonuç AFP'nin embriyo dondurma işlemi üzerindeki yararlı etkilerinin olduğunu açıklayan Rubinsky ve arkadaşları (132) tarafından bildirilen çalışmayla çelişmektedir.

Tavşanlarda yapılan bir çalışmada (9), kompakt morula aşamasındaki tavşan embriyoları verici hayvanlardan elde edildikten sonra, %20 EG + %20 DMSO içeren vitrifikasyon solüsyonu içerisinde dondurulmuş ve çözündürme sonrası direkt olarak alıcı anne tavşanlara transfer edilmiştir. Toplam 184 adet embriyo 16 adet taşıyıcıya transfer edilmiş ve bunlardan 15'i toplam 73 (%40) adet yavru doğurmuştur. Aynı çalışmada kontrol grubu olarak 132 adet embriyo 12 adet taşıyıcıya transfer edilmiş ve bunların tümü toplam 72 (%55) adet yavru doğurmuştur. Elde edilen sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmakla birlikte, uygulanan vitrifikasyon yönteminin hem embriyoların saklanması hem de çözündürme sonrası direkt transferleri için uygun olduğu bildirilmiştir.

Blastosist dönemindeki embriyoların VS3 ve EG ile vitrifikasyonları sonucunda elde edilen verilerin her ikisi de benzer şekilde düşük olmuş ve aralarında önemli bir fark bulunmamıştır. Bilindiği üzere, dünyada embriyoları dondurulan ve transfer edilen hayvanların başında sığırlar gelmektedir. Sığır embriyoları özellikle gelişimlerinin geç dönemlerindeki morula ve blastosist aşamasında dondurulmaktadır (133). Blastosist döneminin daha çok tercih edilmesindeki en önemli sebep genellikle tek bir embriyo transferi uygulanan sığırlarda gebelik şansını artırmaktır. Son zamanlarda aynı şekilde beşeri alanda da blastosist dönemindeki embriyoların yaygın şekilde kullanılmalrı blastosist dönemindeki insan embriyolarının da dondurulması ile ilgili çalışmalara olan ilgiyi artırmıştır (69, 134).

Farelerde çiftlik hayvanlarının tersine blastosist dönemindeki embriyoların dondurulmasından elde edilen sonuçlar diğer gelişim dönemindeki embriyoların dondurulmasından elde edilen sonuçlardan genelde daha düşüktür (14, 16, 21).

Nowshari ve Brem (90) genişlemiş fare blastosistlerini EG ve propilen glikol (PG) içeren solüsyonlar içerisinde hızlı dondurma yöntemi ile dondurmuşlardır. Dondurmada

kullanılan tüm solüsyonlar %10 ısı ile inaktive edilmiş FCS ve 0.5 M sükröz içeren M2 solüsyonu içerisinde hazırlanmıştır. Ayrıca tüm işlemler oda ısısında gerçekleştirilmiş ve her iki kriyoprotektanın (EG ve PG) 4.5, 6 ve 7 M'lık solüsyonları kullanılmıştır. Tüm gruplar için embriyo çözündürme işlemi 30°C'lik su banyosunda gerçekleştirilmiş ve sonrasında embriyolar sükrözün azalan konsantrasyonlarını (0.5, 0.25 ve 0.1 M) içeren M2 vasatı içerisinde beşer dakika aralıklarla bekletilmiştir. Çözündürülen bu embriyolar M16 kültür vasatı içerisinde kültüre alınarak gelişimleri kontrol edilmiştir. Yapılan ilk denemelerde ekilibrasyon için blastosistler sırasıyla 0.25 M ve 0.5 M sükröz içeren M2 solüsyonu içerisinde beşer dakika süreyle bekletilmiştir. Daha sonra, embriyolar her iki kriyoprotektanın değişik konsantrasyonlarındaki (4.5, 6 ve 7 M) solüsyonlarını içeren 0.25 ml'lik payetlerin içerisine ağız pipeti yardımıyla transfer edilmiş ve payetlerin uçları ısı ile kapatıldıktan hemen sonra hızlı dondurma yöntemi ile embriyolar dondurulmuştur. En iyi sonucu her iki kriyoprotektanın 7'şer M'lık solüsyonları vermiştir. Daha sonra, ekilibrasyon işlemi için hem yukarıda anlatılan şekilde sükrözün artan konsantrasyonları hem de 1.5 M PG veya EG + 0.25 M sükröz içeren M2 solüsyonlarında embriyolar 5 dakika süreyle bekletilmiştir. Dört farklı şekilde ekilibre edilen embriyolar 7 M PG veya EG + 0.5 M sükröz solüsyonlarında dondurulmuş ve çözündürme sonrası gelişim oranları PG ve EG için sırasıyla sükrözde ekilibre edilenler için %73 ve %83, 1.5M'lık aynı kriyoprotektanı içeren solüsyonda ekilibre edilenler için ise %79 ve %86 olarak bildirilmiştir. Elde edilen bu sonuçların sunulan çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında çok daha iyi sonuçlar olduğu gözlenmektedir. Sunulan çalışmada VS3 solüsyonunun toksisite testi sonucunda blastosist dönemindeki embriyoların açık şekilde zarar gördüğü gözlenmiştir. Aynı durum EG için VS3'e nazaran daha iyi iken, dondurulan embriyolardan çözündürme sonrası gelişim oranı açısından çok düşük sonuç elde edilmiştir. Sunulan çalışmada EG ile gerçekleştirilen vitrifikasyon yönteminden elde edilen başarı oranının düşük olmasının nedeni olarak, anılan çalışmada EG dondurma solüsyonunun FCS ve sükröz ile desteklenirken, sunulan çalışmadaki EG solüsyonunun adı geçen kriyoprotektanlarla desteklenmemesi olarak düşünülebilir. Bunun yanı sıra, özellikle bildirilen çalışmadan farklı olarak 7 M EG solüsyonu içerisinde embriyolar 2 dakika süreyle bekletilmiştir. Bu bekleme süresinin uzun olması da yoğun olan kriyoprotektanın zararlı etki göstermesine neden olmuş olabilir. Üstelik sükröz veya benzeri diğer bir kriyoprotektanın bulunmamasının bu zararı daha da artırmış olabileceği de düşünülebilir.

Shaw ve arkadaşları (26), gelişmiş fare blastosistlerini 1.5 M EG ve 1.5 M 1,2-propanediol solüsyonları içerisinde yavaş dondurma yöntemi ile dondurmuşlar ve çözündürme işleminde 4 farklı yöntem uygulamışlardır. İlk çözündürme protokolünde sıvı azottan çıkarılan payetler direkt olarak 37°C'deki su banyosu içerisine konarak çözündürülürken 2. ve 3. protokollerde ise, payetler sırasıyla havada 15 ve 30 saniye bekletildikten sonra su banyosuna aktararak çözündürülmüştür. Dördüncü protokolde ise, payetler havada tümüyle çözünene dek bekletilmiştir. Son grup diğer gruplara oranla oldukça düşük sonuçlar vermiştir. En iyi sonucu ikinci protokolle çözündürülen embriyolar vermiş ve canlılıklarını koruyan embriyo oranı her iki kriyoprotektan grubu için de %90'nın üzerinde çıkmıştır. Sunulan çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında bu sonuçların çok iyi olduğu gözlenmektedir. Lane ve arkadaşları (135) ise, tek hücreli *in vivo* fare zigotlarını blastosist dönemine dek kültüre ettikten sonra, gelişen tüm blastosistleri kriyolup (embriyoların sıvı azot içerisine daldırılmasında kullanılan taşıyıcı araç) yardımıyla vitrifiye etmişlerdir. Ekilibrasyon için %10 DMSO + %10 EG solüsyonu kullanılmış ve blastosistler bu solüsyonda 2 dakika süre ile bekletilerek ekilibrasyon işlemi tamamlanmıştır. Vitrifikasyon içinse blastosistler %20 DMSO + %20 EG + 10 mg/ml fikal + 0.65 M sükröz içeren solüsyonda ortalama 20 saniye bekletildikten sonra kriyolup aracılığı ile vitrifiye edilmiştir. Çözündürme sonrası gelişim oranı %95.5 olarak bildirilmiştir ki bu değerin sunulan çalışmadan elde edilen sonuçlardan çok üstün olduğu görülmektedir.

Başka bir çalışmada ise, yavaş dondurma yöntemi ile dondurulan blastosist dönemindeki fare embriyolarının çözündürülmesinden sonra elde edilen gelişim oranları 1.5 M EG'ün kullanıldığı dondurma solüsyonu için %49, 1.5 M gliserolün kullanıldığı dondurma solüsyonu içinse %65 olarak bildirilmiştir (118). Anılan sonuçların her ikisinin de sunulan çalışma sonuçlarından daha iyi olduğu görülmektedir. Ancak anılan çalışmada embriyolar yavaş dondurma yöntemi ile dondurulmuştur.

Kong ve arkadaşları (2), fare blastosistlerini OPS ve cam mikropipet (glass micropipette, GMP) yöntemleri ile aynı vitrifikasyon solüsyonlarını (ekilibrasyon için %10 EG + %10 DMSO; vitrifikasyon içinse %16.5 EG + %16.5 DMSO + sükröz) kullanarak vitrifiye etmişlerdir. Uygulanan protokol gereği embriyolar ekilibrasyon vasatında 1 dakika bekletilmiş ve sonrasında vitrifikasyon solüsyonuna aktarılmıştır. Embriyoların bu solüsyon içerisinde bekleme süresi 25 saniyeyi aşmamıştır. Çözündürme sonrası elde edilen gelişim oranları OPS, GMP ve kontrol grupları için sırasıyla %88.7, %90.0 ve %98.3 olarak bildirilmiştir. Vitrifiye edilen her iki grup arasında önemli bir fark

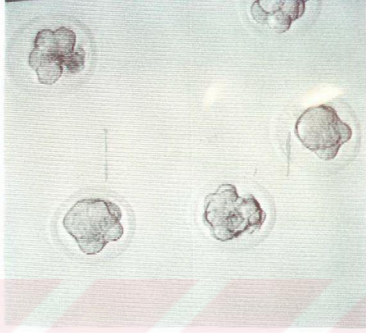
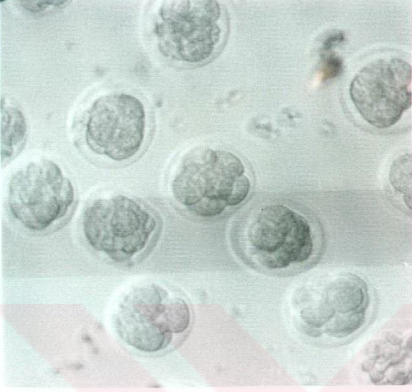
bulunmamıştır. Sunulan çalışma bulgularından oldukça iyi sonuçların elde edildiği bildirilen çalışmada, embriyoların sunulan çalışmada uygulanana göre çok daha kısa süreler için vitrifikasyon solüsyonlarına maruz bırakıldığı önemli bir fark olarak göze carpmaktadır.

Daha önce de bahsedildiği gibi sığır embriyolarının dondurularak saklanmasıyla çoğunlukla blastosist dönemindeki embriyolar tercih edilmektedir. Sığır blastosistlerinin dondurulması ile ilgili yapılan çalışmalarda %34-95 arasında değişen sonuçlar alındığı görülmektedir (78, 80, 122, 136).

Özellikle dünyada çok sayıda değişik fare hatlarını üreten fare üniteleri bulunmaktadır. Bu tür ünitelerin hemen hepsinde değişik fare ırklarından embriyolar dondurularak sonradan kullanılacak şekilde embriyo bankaları kurulmaktadır. Aynı şekilde transgenik fare üreten laboratuvarlarda da transgenik hattan elde edilen embriyolar dondurularak saklanmaktadır. Böylelikle hastalık, yangın ve benzeri afet durumlarında tüm fareler kaybedilse bile, dondurulmuş embriyolardan yapılacak transferlerle kaybedilen farelerin yeniden üretimi söz konusu olacaktır. Sonuç olarak, embriyoların dondurularak saklanmasına yönelik çalışmalar ülkemiz açısından hem bilimsel alanda hem de üretime yönelik uygulamalarda büyük gelişmeler sağlayacaktır.

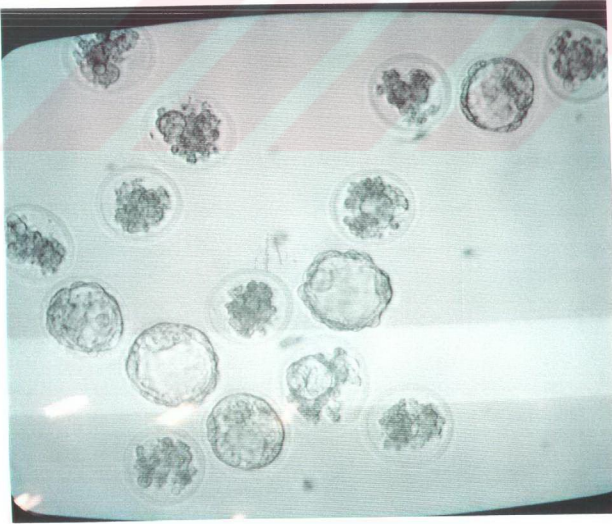
Sunulan çalışmada hibrit CB6F1 farelerinden (C57BL/6J X BALB/C) elde edilen morula ve blastosist dönemindeki embriyoların vitrifikasyonu kısaca VS3 ve EG diye adlandırılan iki ayrı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Blastosist dönemindeki embriyolardan çözüldürme sonrası elde edilen gelişim oranları her iki yöntemde de oldukça düşük bulunmuştur. Morulalar açısından yapılan karşılaştırmada ise VS3 yöntemi ile vitrifiye edilen gruptan elde edilen sonuç EG grubundan elde edilen sonuçtan daha iyi bulunmuştur. Morula toksisite testi için kullanılan kontrol grubu ile VS3 yöntemi ile dondurulan morulaların gelişimleri arasında da fark bulunmamıştır. Tüm bu sebeplerden dolayı, çalışmanın sonucunda morula dönemindeki hibrit fare embriyolarının VS3 vitrifikasyon yöntemi ile başarılı şekilde dondurulabileceği kanısına varılmıştır.

## EKLER



Şekil – 8 2.5 günlük gebe farelerden elde edilen embriyolar (morula dönemi)

Şekil – 9 Vitrifikasyon solüsyonu içerisinde dehidre olmuş morulalar



Şekil – 10 Çözündürme sonrası morulalardan gelişen blastosistler

## KAYNAKLAR

1. SEVİNÇ A. Dölerme ve sun'i tohumlama, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları:397, 3. baskı, Ankara Üniversitesi Basımevi, sayfa 160-163, 1983.
2. KONG IK, LEE SI, CHO SG, CHO SK, PARK CS. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*, 53: 1817-1826, 2000.
3. PALASZ AT, MAPLETOFT RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances*, 14: 127-149,1996.
4. LOPEZ-BEJAR M, LOPEZ-GAITUS F, CAMON J, RUTLLANT J, LABERNIA J. Development in vitro of rabbit embryos after freezing by two step or ultra-rapid cooling methods. *Zentralbl Veterinarmed A*, 41: 780-790, 1994.
5. OTOI T, KOYAMA N, YAMAMOTO K, HORIKITA N, TACHIKAWA S, SUZUKI T. Developmental competence of frozen-thawed blastocysts from fair-quality bovine embryos cultured with  $\beta$ -mercaptoethanol. *The Veterinary Journal*, 159: 282-286, 2000.
6. JIANG JY, UMEZU M, SATO E. Vitrification of two-cell rat embryos derived from immature hypothyroid rdw rats by in vitro fertilization in ethylene glycol-based solutions. *Cryobiology*, 38: 160-164, 1999.
7. BERTHELOT F, MARTINAT-BOTTE FM, LOCATELLI A, PERREAU C, TERQUI M. Piglets born after vitrification of embryos using open pulled straw method. *Cryobiology*, 41: 116-124, 2000.
8. DATTENA M, PTAK G, LOI P, CAPPAI P. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, 53: 1511-1519, 2000.
9. VICENTE JS, GARCIA-XIMENEZ F. Direct transfer of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 45 : 811-815, 1996.
10. POLGE C, SMITH AU, PARKES AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666-667, 1949.
11. AGCA Y. Post-thaw survival and pregnancy rates of intact and biopsied and sexed *in vitro* produced bovine embryos after vitrification, Master Thesis, University of Wisconsin-Madison, Madison WI, 1994.
12. WINSTON NJ, JOHNSON MH. Can the mouse embryo provide a good model for the study of abnormal cellular development seen in human embryos? *Human Reproduction*, 7: 1291-1296, 1992.
13. MATSON PL, GRAEFLING J, JUNK SM, YOVICH JL, EDIRISINGHE WR. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in vitro fertilization programme. *Human Reproduction*, 12: 1550-1553, 1997.
14. WHITTINGHAM DG, LEIBO SP, MAZUR P. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *Science*, 178: 411-414, 1972.
15. WILMUT I, ROWSON LEA. The successful low temperature preservation of mouse and cow embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 33: 352-353, 1973.
16. CSEH S, HORLACHER W, BREM G, CORSELLI J, SEREGI J, SOLT L, BAILEY L. Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions. *Theriogenology*, 52: 103-113, 1999.
17. DINNYES A, CAROLAN C, LONERGAN P, SOLT L, MASSIP A, MERMILLOD P. In vitro survival of IVF bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology*, 43: 197, 1995.

18. UECHI H, TSUTSUMI O, MORITA Y, TAKAI Y, TAKETANI Y. Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development. *Human Reproduction*, 14: 2827-2832, 1999.
19. LUDWIG M, MUSCHALLA H, AL-HASANI S, DIEDRICH K. The effect of multiple cryopreservation procedures and blastomere biopsy on the in-vitro development of mouse embryos. *Human Reproduction*, 13: 3165-3168, 1998.
20. DINNYES A, WALLACE GA, RALL WF. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods. *Molecular Reproduction and Development*, 40: 429-435, 1995.
21. CSEH S, CORSELLI J, NEHLSSEN-CANNARELLA SL, BAILEY LL, SZALAY AA. The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology*, 48: 43-50, 1997.
22. EDASHIGE K, ASANO A, AN TZ, KASAI M. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology*, 38: 273-280, 1999.
23. AKSOY M, TAKAHASHI Y, HISHINUMA M, ELSBEIKH AS, TANAKA A, KANAGAWA H. Influences of retrieval stages and glutathione addition on post-thaw viability of quick frozen mouse morula during in vitro culture. *Theriogenology*, 51: 681-687, 1999.
24. MARTINEZ AG, MATKOVIC M. Cryopreservation of bovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 49: 1039-1049, 1998.
25. VAN DEN ABBEEL E, CAMUS M, VAN WAESBERGHE L, DEVROEY P, VAN STEIRTEGHEM AC. A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen. *Human Reproduction*, 12: 1554-1560, 1997.
26. SHAW JM, WARD C, TROUNSON AO. Survival of mouse blastocysts slow cooled in propanediol or ethylene glycol is influenced by the thawing procedure, sucrose and antifreeze proteins. *Theriogenology*, 43: 1289-1300, 1995.
27. VAN WAGTENDONK-DE LEEUW AM, DEN DAAS JHG, RALL WF. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification of one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, 48: 1071-1084, 1997.
28. KOCOSKI LJ, POPOVSKI K, DOVENSKI T, PETKOV V, TROJACANEC P, GEORGIEVSKI B, MICKOVSKI G. Examination of the possibilities of direct transfer method for freezing bovine embryos in the field. *Macedonian Journal of Reproduction*, 1: 3-9, 1995.
29. DOCHI O, YAMAMOTO Y, SAGA H, YOSHIBA N, KANO N, MAEDA J, MIYATA K, YAMAUCHI A, TOMINAGA K, ODA Y, NAKASHIMA T, INOHAE S. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, 49: 1051-1058, 1998.
30. RALL WF, FAHY GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos. *Nature*, 313: 573-574, 1985.
31. KULESHOVA L, GIANAROLI L, MAGLI C, FERRARETTI A, TROUNSON A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Human Reproduction*, 14: 3077-3079, 1999.

32. KULESHOVA LL, MACFARLANE DR, TROUNSON AO, SHAW JM. Sugar exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, 38: 119-130, 1999.
33. PUGH PA, TERVIT HR, NEIMANN H. Effect of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Animal Reproduction Science*, 58: 9-22, 2000.
34. DONNAY I, AUQUIER PH, KAIDI S, CAROLAN C, LONERGAN P, MERMILLOD P, MASSIP A. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Animal Reproduction Science*, 52: 93-104, 1998.
35. CAMPBELL BK, PICTON HM. Oocyte storage. *Current Obstetrics and Gynaecology*, 9: 203-209, 1999.
36. PEYMER M, CHECK JH, SUMMERS D, CHOE J. Deferring fresh embryo transfer (ET) for fear of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in favor of cryopreservation with subsequent frozen ET does not reduce pregnancy rates (PRs) when using a simplified freeze/thaw protocol. Editors: GOMEL V, LEUNG PCK. *Proceedings of the 10th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, Vancouver, Canada, pages 91-94, 1997.
37. İLERİ İK. Embryo transferi. Editörler: İLERİ İK, AK K, PABUÇÇUOĞLU S, USTA S. *Reproduksiyon ve sun'i tohumlama*, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu No: 23, İstanbul Üniversitesi matbaası, İstanbul, sayfa 164-174, 1994.
38. TEKELİ T. Embrio nakli. Editör: ALAÇAM E. *Evcil Hayvanlarda reproduksiyon, sun'i tohumlama, doğum ve infertilite*, 1. baskı, Dizgievi Yayıncılık, Konya, sayfa 103-119, 1994.
39. CURTIS JL. *Cattle embryo transfer procedure*, 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press, London, page 31-48, 1991.
40. CHECK JH, BAKER A, BENFER K, LURIE D, KATSOFF D. Transfer of cryopreserved embryos improved pregnancy rates in patients with damage to the functional integrity of the sperm membrane as measured by hypo-osmotic swelling test. *Fertility and Sterility*, 65: 1241- 1244, 1996.
41. SUMMERS D, CHECK JH, CHOE J, BAKER A. Pregnancy rates following the transfer of thawed embryos that had been cryopreserved for long intervals using simplified freezing and thawing technique. Editors: GOMEL V, LEUNG PCK. *Proceedings of the 10th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, Vancouver, Canada, pages 71-74, 1997.
42. RALL WF. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Animal Reproduction Science*, 28: 237-245, 1992.
43. TADA N, SATO M, KASAI K, OGAWA S. Production of transgenic mice by microinjection of DNA into vitrified pronucleate stage eggs. *Transgenic Research*, 4: 208-213, 1995.
44. AGCA Y, MONSON RL, NORTHEY DL, PESCHEL DE, SCHAEFER DM, RUTLEDGE JJ. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology*, 50: 129-145, 1998.
45. PUGH PA, ANKERSMITH AEL, MCGOWAN LT, TERVIT HR. Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology*, 50: 495-506, 1998.



46. SHAW JM, KULESHOVA LL, MACFARLANE DR, TROUNSON AO. Vitrification of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, ficoll, or dextran. *Cryobiology*, 35: 219-229, 1997.
47. O'NEIL L, PAYNTER SJ, FULLER BJ, SHAW RW, DEVRIES AL. Vitrification of mature oocytes in a 6 M Me2SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: the effect of temperature. *Cryobiology*, 37: 59-66, 1998.
48. WANG JH. A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation. *Cryobiology*, 41: 1-9, 2000.
49. DINNYES A, DAI Y, JIANG S, YANG X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 63: 513-518, 2000.
50. STOREY KB, STOREY JM. Frozen and alive. *Scientific American*, 12: 92-97, 1990.
51. CROWE JH, CARPENTER JF, CROWE LM. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 60: 73-103, 1998.
52. DUMAN JG. Insects antifreezes and ice-nucleating agents. *Cryobiology*, 19: 613-627, 1982.
53. KNIGHT CA, DUMAN JG. Inhibition of recrystallization of ice by insects thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology*, 23: 256-262, 1986.
54. VAJTA G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 357-364, 2000.
55. RALL WF. Factors affecting the survival of vitrified mouse embryos. *Cryobiology*, 24: 387-402, 1987.
56. RALL WF, MEYER TK. Zona fracture damage and its avoidance during cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*, 31: 683-692, 1989.
57. KASAI M, ZHU SE, PEDRO PB, NAKAMURA K, SAKURAI T, EDASHIGE K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology*, 33: 459-464, 1996.
58. MASSIP A, VAN DER ZWALMEN P, SCHEFFEN B, ECTORS F. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Animal Reproduction Science*, 19: 117-129, 1989.
59. MACFARLANE DR, FORSYTH M. Recent insight on the role of cryoprotective agents in vitrification. *Cryobiology*, 27: 345-358, 1990.
60. ARAKAWA T, CARPENTER JF, KITA YA, CROWE JH. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. *Cryobiology*, 27: 401-415, 1990.
61. PALASZ AT, ALKEMADE S, MAPLETOFT RJ. Sodium hyaluronate as a substitute for biological protein in bovine and mouse freezing. *Cryobiology*, 30: 172-178, 1993.
62. LEIBO SP, ODA K. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Cryo-letters*, 14: 133-144, 1993.
63. RALL WF, REID DS, POLGE C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. *Cryobiology*, 21: 106-121, 1984.
64. MAHMOUDZADEH AR, VAN SOOM A, YSEBAERT MT, KRUIF A. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival on in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, 42: 1387-1397, 1994.
65. WURTH IA, REINDERS JMC, RALL WF, KRUIP TAM. Developmental potential of in vitro produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology*, 42: 1275-1284, 1994.
66. HASLER JF, HENDERSON WB, HURTTGEN PJ, JIN ZQ, MCCAULEY AD, MOWER SA, NEELY B, SHUEY LS, STOKES JE, TRIMMER SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43: 141-152, 1995.

67. AGCA Y, MONSON RL, NORTHEY DL, SCHAEFER DM, RUTLEDGE JJ. Post-thaw pregnancy rates comparison of vitrified and frozen in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, 45: 175, 1996.
68. AGCA Y, MONSON RL, NORTHEY DL, ABAS MAZNI O, SCHAEFER DM, RUTLEDGE JJ. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*, 50: 147-162, 1998.
69. LANE MW, AHERN TJ, LEWIS IM, GARDNER DK, PEURA TT. Cryopreservation and direct transfer of in vitro produced bovine embryos: a comparison between vitrification and slow-freezing. *Theriogenology*, 49: 170, 1998.
70. O'KEARNEY-FLYNN M, WADE M, DUFY P, GATH V, BOLAND MP, DOBRINSKY JR. Effect of cryopreservation on IVP cattle development in vitro and in vivo. *Theriogenology*, 49: 173, 1998.
71. KAIDI S, DONNAY P, LAMBERT P, DESSY F, MASSIP A. Osmotic behavior of in vitro produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology*, 41: 106-115, 2000.
72. YANG BS, LEIBO SP. Viability of in vitro derived bovine zygotes cryopreserved in microdrops. *Theriogenology*, 51: 178, 1999.
73. PAPIS K, SHIMIZU M, IZAIKE Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine in vitro matured oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, 51: 173, 1999.
74. STEPONKUS PL, MYERS SP, LYNCH DV, GARDNER L, BRONSHTEYN V, LEIBO SP, RALL WF, PITT RE, LIN TT, MACINTYRE RJ. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, 345: 170-172, 1990.
75. MAZUR P, COLE KW, HALL WH, SCHEUDERS PD, MAHOWALD AP. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. *Science*, 258: 1932-1935, 1992.
76. MARTINO A, SONGSAGEN N, LEIBO SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction*, 54: 1059-1069, 1996.
77. ARAV A, ZERON Y. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is affected by composition and concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology*, 47: 341, 1997.
78. PARK SP, KIM EY, KIM DI, PARK NH, WON YS, YOON SH, CHUNG KS, LIM JH. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Human Reproduction*, 14: 2838-2843, 1999.
79. VAJTA G, HOLM P, KUWAYAMA M, BOOTH PJ, JACOBSEN H, GREVE T, CALLESEN H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 51: 53-58, 1998.
80. VAJTA G, LEWIS IM, KUWAYAMA M, GREVE T, CALLESEN H. Sterile application of the open pulled straw (OPS) vitrification method. *Cryo-Letters*, 19: 389-392, 1998.
81. VAJTA G, RINDOM N, PEURA TT, HOLM P, GREVE T, CALLESEN H. The effect of media, serum, and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, 52: 939-948, 1999.
82. XIANG-HONG L, ZHANG T, RAWSON DM. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Cryobiology*, 39: 236-242, 1999.
83. JANIK M, KLEINHANS FW, HAGEDORN M. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology*, 41: 25-34, 2000.

84. RAYOS AA, TAKAHSI Y, HISHINUMA M, KANAGAWA H. Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose. *Theriogenology*, 37: 595-603, 1992.
85. PALASZ AT, GUSTAFSSON H, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, GUSTA L, LARSSON B, MAPLETOFT RJ. Vitrification of bovine IVF blastocysts in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. *Theriogenology*, 47: 865-879, 1997.
86. MARTINEZ AG, DE MATOS DG, FURNUS CC, BROGLIATTI GM. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, 50: 757-767, 1998.
87. FURNUS CC, DE MATOS DG, MARTINEZ AG, MATKOVIC M. Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viability of in-vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 47: 481-490, 1997.
88. NOWSHARI MA, BREM G. The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 53: 1157-1166, 2000.
89. ISHIDA GM, SAITO H, OHTA N, TAKAHASHI T, ITO MM, SAITO T, NAKAHARA K, HIROI M. The optimal equilibration time for mouse embryos frozen by vitrification with trehalose. *Human Reproduction*, 12: 1259-1262, 1997.
90. NOWSHARI MA, BREM G. Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of expanded mouse blastocyst frozen by a simple rapid-freezing procedure. *Theriogenology*, 50: 1001-1013, 1998.
91. HAYASHI D, KOBAYASHI J, MIZUNO J, SAITOH K, HIRANO S. Birth of piglets from frozen embryos. *Veterinary Record*, 125: 43-44, 1989.
92. POLLARD JW, LEIBO SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41: 101-106, 1994.
93. DOBRINSKY JR, PURSEL VG, LONG CR, JOHNSON LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biology of Reproduction*, 62: 564-570, 2000.
94. TADA N, SATO M, AMANN E, OGAWA S. A simple and rapid method for cryopreservation of mouse 2-cell embryos by vitrification: beneficial effect of sucrose and raffinose on their cryosurvival rate. *Theriogenology*, 40: 333-344, 1993.
95. EROGLU A, RUSSO MJ, BIEGANSKI R, FOWLER A, CHELEY S, BAYLEY H, TONER M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 18: 163-167, 2000.
96. KASAI M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science*, 42: 67-75, 1996.
97. USHIJIMA H, YAMAKAWA H, NAGASHIMA H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 60: 534-539, 1999.
98. LE GAL F. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes frozen at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 45: 1177-1185, 1996.
99. MEN HS, CHEN JC, JI WZ, SHANG EY, YANG SC, ZOU RJ. Cryopreservation of kunming mouse oocytes using slow cooling, ultrarapid cooling and vitrification protocols. *Theriogenology*, 47: 1423-1431, 1997.
100. LIM JM, KO JJ, HWANG WS, CHUNG HM, NIWA K. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. *Theriogenology*, 51: 1303-1310, 1999.
101. ISACHENKO EF, NAYUDU PL. Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromatin and spindle normality and cumulus integrity. *Human Reproduction*, 14: 400-408, 1999.

102. STACHECKI JJ, WILLADSEN SM. Cryopreservation of mouse oocytes using a medium with low sodium content: effect of plunge temperature. *Cryobiology*, 40: 4-12, 2000.
103. DHALI A, MANIK RS, DAS SK, SINGLA SK, PALTA P. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology*, 53: 1295-1303, 2000.
104. HURTT AE, LANDIM-ALVARENGA F, SEIDEL GE, SQUIRES EL. Vitrification of immature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*, 54: 119-128, 2000.
105. STACHECKI JJ, COHEN J, WILLADSEN S. Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 59: 395-400, 1998.
106. STACHECKI JJ, COHEN J, WILLADSEN S. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology*, 37: 346-354, 1998.
107. BAĞIŞ H, ARAT S, KESKİNTEPE L, ODAMAN H, SAĞIRKAYA H. Fare embriyolarında uygulamalı mikroenjeksiyon ve transgenik manipulasyonlar. Uygulamalı Eğitim Kurs Kitabı, TÜBİTAK, Gebze/Kocaeli, sayfa 16-23, 2000.
108. HOGAN B, BEDDINGTON R, CONSTANTINI F, LACY E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manuel, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994.
109. BAĞIŞ H, KESKİNTEPE L, ODAMAN H, SAĞIRKAYA H. Effects of CZB medium on the two cell block of preimplantation mouse embryos. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* (in press).
110. BARNETT DK, BAVISTER BD. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Molecular Reproduction and Development*, 43: 105-133, 1996.
111. BAVISTER BD. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*, 53: 616-626, 2000.
112. GARY ML, RAYMOND WW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-416, 1983.
113. SÜMBÜLOĞLU K, SÜMBÜLOĞLU V. Biyoistatistik, 7. baskı, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, sayfa 156-174, 1997.
114. JACKOWSKI SC, LEIBO SP, MAZUR P. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. *Journal of Experimental Zoology*, 212: 329-341, 1980.
115. SCHNEIDER U, MAZUR P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 21: 68-79, 1984.
116. ALI J, SHELTON N. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98: 459-465, 1993.
117. SOMMERFIELD V, NEIMANN H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 38: 95-105, 1999.
118. EMILJANI S, VAN DEN BERGH M, VANNIN AS, BIRAMANE J, ENGLERT YVON. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Human Reproduction*, 15: 905-910, 2000.
119. ISHIMORI H, TAKAHASHI Y, KANAGAWA H. Factors affecting survival of mouse blastocyst vitrified by a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, 38:1175-1185, 1992.

120. ISHIMORI H, SAEKI K, INAI M, NAGAO Y, ITASAKA J, MIKI Y, SEIKE N, KAINUMA H. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, 40: 427-433, 1993.
121. GUTIERREZ A, GARDE J, ARTIGA CG, MUNOZ I, PINTADO B. In vitro survival of murine morulae after quick freezing in the presence of chemically defined macromolecules and different cryoprotectants. *Theriogenology*, 36: 1111-1120, 1993.
122. OHBOSHI S, FUJIHARA N, YOSHIDA T, TOMOGANE H. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro-derived bovine blastocysts. *Animal Reproduction*, 48: 27-36, 1997.
123. NAITANA S, LOI P, LEDDA S, CAPPAI P, DATTENA M, BOGLIOLI L, LEONI G. Effect of biopsy and vitrification on in vitro survival of ovine embryos at different stages of development. *Theriogenology*, 46: 813-824, 1996.
124. NAITANA S, LEDDA S, LOI P, LEONI G, BOGLIOLI L, DATTENA M, CAPPAI P. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Animal Reproduction Science*, 48: 247-256, 1997.
125. DOCHI O, IMAI K, TAKAKURA H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Animal Reproduction Science*, 38: 179-185, 1995.
126. ISHIMORI H, TAKAHASHI Y, KANAGAWA H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Theriogenology*, 37: 481-487, 1992.
127. GORDON I. Laboratory production of cattle embryos, CABI Publishing, Wallingford, page 242-261, 1994.
128. MELLO MRB, QUEIROZ VS, ASSUMPCAO MEOA, TAVARES LMT, LIMA AS, BURATINI J, VISINTIN JA. Cryopreservation of mouse morulae: a comparison among slow-freezing, quick freezing and vitrification methods. *Theriogenology*, 51: 448, 1999.
129. PALASZ AT, THUNDATHIL J, DE LA FUENTE J, MAPLETOFT RJ. Effect of reduced concentrations of glycerol and various macromolecules on the cryopreservation of mouse and cattle embryos. *Cryobiology*, 41: 35-42, 2000.
130. DESAI N, LAWSON J, GOLDFARB J. Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morula to the blastocyst stage. *Human Reproduction*, 15: 410-418, 2000.
131. LEBOEUF B, MAXWELL WMC, EVANS G. Survival of mouse morulae vitrified in media containing antifreeze protein type 1. *Theriogenology*, 47: 439, 1997.
132. RUBINSKY B, ARAV A, DEVRIES AL. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fishes. *Cryobiology*, 29: 69-79, 1992.
133. LEIBO SP. A one-step method for non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21: 767-790, 1984.
134. GARDNER DK, SCHOOLCRAFT WB, WANGLEY L, SCHLENKER T, STEVENS J, HESLA J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in vitro fertilization. *Human Reproduction*, 13: 3434-3440, 1998.
135. LANE M, SCHOOLCRAFT WB, GARDNER DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*, 72: 1073-1078, 1999.
136. DINNYES A, CAROLAN C, LONERGAN P, MASSIP A, MERMILLOD P. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. *Theriogenology*, 46: 1425-1439, 1996.

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam ile ilgili çalışmaların her aşamasında değerli bilgi görgü, öneri yardım ve desteklerini hiçbir şekilde esirgemeyen danışmanlarım Anabilim Dalı Öğretim Üyemiz Sayın Yard. Doç. Dr. İbrahim DOĞAN ve TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM) Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Estitüsü (GMBAE) Transgen ve Deneysel Hayvanlar Laboratuvar Sorumlusu Sayın Dr. Haydar BAĞIŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmamı yürütmemdeki katkı ve desteklerinden dolayı TÜBİTAK MAM GMBAE Müdürü Sayın Doç. Dr. Kemal BAYSAL'a ve deneyleri yaptığım Transgen ve Deneysel Hayvanlar Laboratuvarında her türlü yardım ve desteklerini asla esirgemeyen ve deneylerin gerçekleştirilmesindeki önemli katkılarından dolayı Araştırmacı Sayın Hande ODAMAN ve Teknisyenler Seyfettin ÇETİN, Şakir SEKMEN ve Gazi TURGUT'a da teşekkürlerimi içtenlikle sunarım.

Özellikle tezimin yazım aşamasındaki çok değerli öneri ve katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. M. Kemal SOYLU ve çalışmadan elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde bilgilerinden yaralandığım Zooteknik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yard. Doç. Dr. Faruk BALCI'ya özel teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak tüm eğitim hayatı boyunca her zaman yanımda olan ve her türlü imkan iyi bir eğitim almam için seferber eden anneme, kardeşlerime ve özellikle tez çalışmam süresince her türlü manevi ve duygusal desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sevgili Sözlüm Avukat Tuba BEŞTEPE'ye tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hakan SAĞIRKAYA  
Ünvanı : Araştırma Görevlisi  
Doğum Yeri ve Yılı : Keşan, 01.03.1971  
Medeni Hali : Bekar  
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti  
Yabancı Dil : İngilizce  
İş Adresi : Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı  
16059 Görükle BURSA  
Ev adresi : Hüdavendigar Mah. 14. Sok. 40/5 Dikkaldırım  
Osmangazi BURSA  
Telefon : 224-4429200/148  
Fax : 224 4428025  
e-mail : hakans@uludag.edu.tr

### Eğitim Durumu

1988 – 1993 : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekim  
1994 – 1997 : University of Wisconsin-Madison Meat and Animal Science, M.S.  
1998 – Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama  
Anabilim Dalı, Doktora Öğrencisi

### Çalıştığı Kurum ve Kuruluşlar

1997 – Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi

### Bilimsel Yayınlar

1. BAĞIŞ H, KESKİNTEPE L, ODAMAN H, SAĞIRKAYA H. Effects of CZB medium on the two cell block of preimplantation mouse embryos. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences (in press).
2. BAĞIŞ H, SAĞIRKAYA H. Klonlama. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (baskıda).

3. BAĞIŞ H, ARAT S, KESKİNTEPE L, ODAMAN H, SAĞIRKAYA H. Fare Embriyolarında Uygulamalı Mikroenjeksiyon ve Transgenik Manipulasyonlar. Uygulamalı Eğitim Kurs Kitabı. TÜBİTAK, Gebze/Kocaeli, sayfa 16-23, 2000.
4. SAĞIRKAYA H. Preimplantasyon dönemdeki embriyoların cinsiyetlerinin PCR'la belirlenmesi. Veteriner Hekim Günceli, 2: 4, 1999.
5. SAĞIRKAYA H. Effects of CR1aa and TCM-199 media on in vitro embryonic development until blastocyst stage in cattle. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17: 55-63, 1998.