

## Memeli Embriyolarının Kriyoprezervasyonu

Hakan SAĞIRKAYA\* Haydar BAĞIŞ\*\*

Geliş Tarihi: 07.04.2003

Kabul Tarihi: 01.08.2003

**Özet:** Memeli embriyolarının dondurularak saklanması 1970'li yılların ilk yarısından günümüze değin bilim adamlarınca çalışılan önemli konulardan birisidir. Beşeri alanda ve sığırcılık alanında embriyoların kriyoprezervasyonu rutin olarak uygulanmaktadır. Son yıllarda özellikle vitrifikasyon yöntemi ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu derlemede embriyoların dondurulmasıyla ilgili yöntemler (özellikle vitrifikasyon), kriyoprezervasyonun mekanizması, kullanılan kriyoprotektif maddeler, ve kriyoprezervasyona etki eden faktörler açıklanacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Embriyo, kriyoprezervasyon, kriyoprotektif maddeler, vitrifikasyon.

### Cryopreservation of Mammalian Embryos

**Summary:** Cryopreservation of mammalian embryos has been an important subject studied by researchers since early 1970's. Cryopreservation of embryos has routinely been applied in human medicine and cattle breeding. Recently, intensive researches related to the vitrification method have especially been carried out. In this review, methods about embryo cryopreservation (especially vitrification), mechanism of cryopreservation, cryoprotectants and factors affecting cryopreservation would be clarified.

**Key Words:** Embryo, cryopreservation, cryoprotectants, vitrification.

### Giriş

Gliserolün 1949 yılında sperma hücrelerinin dondurulmasında başarıyla kullanılması<sup>46</sup>, embriyoların da dondurularak saklanması için gerekli araştırmaların yapılmasının başlangıcını oluşturmuştur. İlk başarılı embriyo dondurma işlemi 1972 yılında Whittingham ve ark.<sup>63</sup> tarafından fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Wilmut ve Rowson<sup>64</sup>, dondurup-çözündürdükleri sığır embriyolarından gebelik elde ettiklerini bildirmiştir. Yapılan bu ilk çalışmalarda DMSO (dimetilsülfoksit) kriyoprotektan olarak kullanılmış ve dakikada 0.2°C'lik bir soğutma hızı uygulanmıştır. Sonraki yıllarda farklı hayvan ve insan embriyoları başarılı şekilde dondurulmuştur<sup>5,11,17,19,25,35,39</sup>.

Dondurma-çözündürme sonrası canlılık oranları türler arasında bazı farklılıklar göstermektedir. Buna neden olan unsurlar olarak; dondurma ve çözündürme işlemlerinde uygulanan donma ve çözünme hızları, embriyoların büyüklükleri ve gelişim dönemleri, hücrelerin geçirgenlik özellikleri ve kriyoprotektanların ozmotik özellikleri ile toksisiteleri sıralanabilir<sup>2,3,16,28,42</sup>. Kriyoprezervasyon işleminde kullanılan yöntemleri geleneksel yavaş dondurma (slow freezing), hızlı dondurma (rapid freezing) ve vitrifikasyon (vitrification) olarak üç grupta incelemek mümkündür<sup>10,16,42,54</sup>. Başlangıçta embriyoların dondurulmasında yavaş ya da kademeli soğutmayı gerektiren yavaş dondurma yöntemi kullanılmıştır<sup>31,59,60</sup>. Geleneksel bir yöntem olan yavaş dondurmada, embriyoların dondurulması için çok pahalı ve komplike cihazlara gereksinim vardır. Hızlı dondurma işleminde

\* Araş. Gör. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Suni Tohumlama ABD, Görükle/BURSA.

\*\* Doç. Dr.; TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Gebze/KOCAELİ.

ise, en az iki farklı kriyoprotektan madde ve yüksek donma hızları kullanılır. Yapılan çalışmalar sonucunda, 1985 yılında vitrifikasyon denilen embrioyu dondurma sistemi geliştirilmiştir<sup>49</sup>. Bahsedilen bu iki yöntem sayesinde yavaş dondurma yönteminde gerekli olan pahalı ve komplike cihazlara olan gereksinim ortadan kalkmıştır. Vitrifikasyonda, buz kristallerinin hiç şekillenmediği vitroz ya da camsı bir durum yaratılarak, hücrelerin, dokuların ve organların direkt olarak sıvı azot içerisine daldırılmasıyla dondurulmaları sağlanmaktadır. Çeşitli kimyasalların sulu çözeltilerinin camsı yapı şekillendirme özelliklerinin önemli derecede değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Son yıllarda, embrioların dondurulma işleminde vitrifikasyon yöntemi oldukça yaygın biçimde kullanılmaktadır. Donma ve çözünme işlemlerinde hücrelerin zarar görmesini önlemek amacıyla, dondurma ve çözündürme solüsyonları içerisine kriyoprotektan diye adlandırılan çeşitli maddeler katılmaktadır. Günümüzde uygulanan dondurma yöntemlerinde çeşitli kriyoprotektanlar ile yavaş veya hızlı soğutma ve ısıtma yöntemleri kullanılmaktadır<sup>53</sup>.

Uygulanmakta olan tüm dondurma yöntemlerindeki temel prensip, donma ve çözünme sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek, hücrelerin buz kristallerinden görece zararı önlemektir. Bunu sağlamak amacıyla hücre içi sıvısının, hücre membranından geçebilen başka bir deyişle nüfuz edebilen ve hücrelere olabildiğince zararsız olan kriyoprotektan maddelerle yer değiştirmesi hedeflenmektedir.

Sunulan derlemede embriyo dondurma uygulamasının avantajları, embrioların dondurulmasıyla ilgili yöntemler, kriyoprezervasyonun mekanizması, kullanılan kriyoprotektif maddeler ve kriyoprezervasyona etki eden faktörler hakkında bazı önemli bilgilerin özetlenmesi amaçlanmıştır.

### **Embriyo Dondurma Uygulamasının Avantajları**

Embriyo Transfer Teknolojisi, Sun'i Tohumlama uygulamasından sonra hayvan ıslahında büyük gelişmelere öncülük etmiştir. Yapılan ilk çalışmalarda taze embriolar transfer işleminde kullanılmıştır. Bu nedenle, uygulamada saha şartlarında büyük problemlerle karşılaşmıştır. Ancak, embrioların başarılı biçimde dondurulabilmesiyle embriyo transfer uygulamaları ticari boyutta uygulanır hale gelmiştir. Taze embriyo

transferlerindeki en büyük sorunlardan birisi, transferlerin yapılacağı taşıyıcı hayvanların önceden senkronize edilmesi zorunluluğudur. Ayrıca, tek bir embriyo transferi için en az iki taşıyıcının senkronize edilerek transfere uygun taşıyıcının garanti edilmesi, maliyeti artıran kısıtlayıcı diğer bir unsurdur.

Embrioların dondurulması ile taşıyıcılarda senkronizasyona gerek kalmadan transfer işlemi gerçekleştirilebildiğinden, maliyette önemli düşmeler gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca, üstün niteliklere sahip hayvanlardan elde edilen embrioların dondurularak farklı bölgelere kolayca transfer edilmeleri de mümkün olabilmekte ve kurulacak embriyo bankası ile nesli tükenmekte olan hayvan varlıklarının korunması sağlanabilmektedir. Dondurulmuş sperma ile sadece babadan gelecek genetik yapıdan yararlanılabilirken, embriyo ile hem anne hem de babadan gelen genlerden doğrudan yararlanılabilir. Embrioların dondurularak saklanmalarıyla, üstün genetik niteliklere sahip olan hayvanların genetik özelliklerinin tüm dünyaya yayılmasında, gen mühendisliği ve biyomedikal çalışmalarda ve özellikle de nesli tükenmekte olan türlerin korunmasında büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Canlı hücrelerin dondurularak uzun yıllar saklanabilmesi ve gerekli durumlarda bunların çözündürülerek kullanılabilmesi bilim dünyasını ilgilendiren en önemli konulardan biri olmaya hala devam etmektedir.

### **Kriyoprezervasyon İşleminde Kullanılan Kimyasal Maddelerin (Kriyoprotektif Maddeler) Etki Mekanizmaları**

Kriyoprotektanlar dondurma ve çözündürme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır<sup>42</sup>. Kriyoprotektan maddeleri, hücre membranından nüfuz edilebilme özelliklerine göre iki ayrı grupta inceleyebiliriz: 1- Hücre membranından geçebilen, yani hücre içerisine nüfuz edebilen (permeating) ve 2- Hücre membranından geçemeyen, yani hücre içerisine nüfuz edemeyen (non-permeating) kriyoprotektanlar.

Hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlığa sahiptirler ve dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol (EG), 1.2 propanediol, 2.3 bütanediol, propilen glikol ve diğer bazı alkoller kapsamaktadır<sup>2,42,53</sup>. Donmanın gerçekleşmesinden önce, ozmotik basınç farkından dolayı, embriyo hücreleri içerisindeki sıvı kriyoprotektan maddeler ile

yer değiştirir ve böylece hem hücre hacmindeki değişiklikler azaltılarak hem de embriyo hücreleri içerisindeki buz kristallerinin oluşumu minimum düzeye indirilerek dondurma işlemi sırasında hücrelerin zarar görmesi minimum düzeye indirilir. Hücre içerisine nüfuz edebilen maddeler, suya bağlanabilme özellikleriyle ve diğer bileşenlerin yüksek konsantrasyonlarından kaynaklanan toksik etkileri azaltarak koruyucu etkilerini gösterirler. Bu gruptaki kriyoprotektanların çoğu yüksek oranda suda çözünebilme yeteneğine ve ısı etkisine sahiptir. Bu nedenle bu niteliklere sahip kriyoprotektanlar suyun hidrojen bağlarını kopararak, suyun yapısını değiştirirler. Aynı zamanda, bu grupta yer alan kriyoprotektanlar su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilmektedirler. Örneğin; gliserol kendi hidroksil grubu ile su molekülündeki mevcut oksijen arasında hidrojen bağı şekillendirmektedir. DMSO'nun 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<sup>2,42,53</sup>.

Hücre içine nüfuz edemeyen (non-permeating) kriyoprotektanlar ise, kendi aralarında iki ayrı gruba ayrılabilir. Bunlar; hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı (glukoz, sükröz, trehaloz, rafinoz, galaktoz ve diğer bazı şekerler) ve yüksek molekül ağırlıklı (polivinil alkol; PVA, polivinil pirrolidon; PVP ve diğer bazı polimerler) kriyoprotektanlardır<sup>2,5,42</sup>. Hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar donma işlemi süresince şekillenen buz kristalleri oluşumunu azaltan etkilerini, soğutmadan önce hücreleri dehidre ederek gösterirler. Hücre içine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar ise, hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi sırasında oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız olacak biçimde değiştirerek etkilerini gösterirler<sup>42</sup>. Bunlardan başka, albumin<sup>47</sup>, fikor<sup>7</sup> ve antifriz protein (AFP)<sup>62</sup> gibi bazı proteinler de hücre içerisine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar içerisinde yer almaktadırlar. Serumdan kaynaklanabilecek kontaminasyonlar nedeniyle, günümüzde genellikle polivinil pirrolidon (PVP) ya da polivinil alkol (PVA) gibi bazı maddeler serum yerine kullanılmaktadır<sup>12,42,47</sup>.

## **Embriyoların Dondurulmasında Kullanılan Yöntemler**

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

### **Geleneksel Yavaş Dondurma (Slow Freezing)**

Bu yöntemle embriyoların dondurulmasında değişik aşamalar mevcut olup sırasıyla 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°C'ler arasında başlatılması (seeding), 3) Kontrollü bir biçimde embriyo dondurma makinesi aracılığıyla -30 ile -70°C'ler arasındaki bir sıcaklığa ulaşıncaya kadar kademeleli yavaş soğutma (0.2-2.0°C/dakika), 4) İstenilen sıcaklığa ulaşıldığında, sıvı azot (-196°C) içerisine daldırma ve saklama, 5) Yaklaşık olarak dakikada 250°C olacak şekilde kontrollü çözündürme (bu işlem karıştırılmayan 25°C'lik su banyosunda kolaylıkla gerçekleştirilebilir), 6) Embriyoların kültüre alınması ya da taşıyıcılara transferlerinden önce kriyoprotektanın uzaklaştırılması. Belirtilen aşamaların her biri, başarılı bir embriyo kriyoprezervasyon işlemi için özel öneme sahiptir<sup>42,52</sup>. Hücre içine nüfuz edebilen bu kriyoprotektanlar, donma ve çözünme sürecinde hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek hücre yapısını korurlar<sup>42</sup>. Donmaya karşı tolerans gösteren hayvanlarda 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, spesifik buz çekirdeklerini oluşturan proteinlerce başlatılır. Seeding diye de adlandırılan buz kristallerinin oluşumunun başlatılması, ani ve hızlı soğumayla birlikte kendiliğinden ve kontrolsüz biçimde buz çekirdeklenmesinin şekillendiği dönemde hızlı dondurmanın zararlı etkilerini önler<sup>15</sup>. Buz kristallerinin oluşumu başladığında, küçük buz kristallerinde daha büyük kristallere dönüşüm yönün-

de bir eğilim şekillenir ki; hücreler için ölümcül etkiye sahip bu durumun önlenmesi yavaş soğutma oranlarının (dakikada 2°C'den daha az) uygulanmasıyla sağlanmaktadır. Böylece, dondurma işlemi süresince hücrelerin dehidre olmaları sağlanır.

### ***Hızlı (Rapid Freezing) veya Çok Hızlı Dondurma (Ultra Rapid Freezing)***

Hızlı dondurma, yüksek donma hızlarının (dakikada yaklaşık 1200-1250°C) uygulanmasından önce hücrelerin kısmen dehidre edildiği dondurma işlemi tanımlamak için kullanılır. Bu yöntemle başarılı bir sonuç almak için gliserol, propandiol, DMSO ya da etilen glikol gibi hücre içine nüfuz edebilen kriyoprotektanlardan birisinin 2 ile 4.5 M'lık ve sükroz, trehaloz, laktoz ya da galaktoz gibi hücre içine nüfuz edemeyen kriyoprotektanlardan birisinin 0.25 ile 0.5 M'lık karışımlarından oluşan dondurma solüsyonlarının kullanılması gerekmektedir<sup>9,44</sup>. Kısa bir ekilibrasyondan sonra, embriyolar kısmen dehidre bir duruma geçerler ve bu aşamada embriyolar sıvı azot buharında çok kısa bir süre tutulup sonra sıvı azot içerisine daldırılır. Aşağıda açıklanacak vitrifikasyon yönteminden farklı olarak, hızlı dondurmada hücre dışı sıvı donar ve dondurma solüsyonunun ozmolaritesinde artma meydana gelebilir. Bunun sonucu olarakta embriyo hücrelerinden daha fazla donabilir su hücre dışına geçiş yapar. Ancak, çözündürme işlemi uygun olmayan çözünme hızları uygulanırsa, hücre içi buz kristalleri şekillenebileceğinden, embriyo zarar görebilir<sup>42</sup>.

### ***Vitrifikasyon (Vitrification)***

Vitrifikasyon; hücrelerin, dokuların ve organların düşük sıcaklıklarda hücre içerisinde tamamıyla vitröz ya da camsı bir durumun yaratılmasıyla dondurulmasını ifade eden bir terim olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde buz kristalleri hiç şekillenmemektedir. Vitrifikasyon prosedürü ilk kez fare embriyolarında başarıyla gerçekleştirilmiştir<sup>49</sup>. Vitrifikasyon yönteminin basitliği, düşük maliyeti ve uygulanan prosedürün kısa zamanda gerçekleştirilebilmesi gibi avantajlarına karşın, kullanımı genellikle deneysel düzeyde kalmıştır. Başarılı bir vitrifikasyon için, viskozitede çok yoğun bir artış gerekmektedir. Bunun için de ya yüksek soğutma oranları ya da düşük sıcaklık derecelerinde viskoziteyi artıran ve buz kristallerinin formasyonunu baskılayan kriyoprotektan solüsyonların kullanımı gerekmektedir<sup>58</sup>.

Vitrifikasyon yönteminde 0.25 ml'lik payetlerin (straw) sıvı azot içerisine direkt olarak daldırılmasıyla sağlanan en yüksek donma hızı, yaklaşık olarak dakikada 2500°C ile sınırlı kalmıştır<sup>42</sup>. Ancak, payetler içerisindeki embriyo ve onların zona pellusidalarında oluşacak çatlama ve kırılmaları önlemek amacıyla yukarıda sözü edilen soğutma ve ısıtma oranlarının tümüyle uygulanamayacağı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir<sup>22,50</sup>. Kriyoprotektanların yaklaşık 5-7 molar gibi yüksek konsantrasyonlarda kullanılması ile vitrifikasyonun sağlanabileceği gösterilmiştir. Bu oran geleneksel yavaş dondurmadaki konsantrasyonların (genellikle 1-2 molar) yaklaşık 2-3 katıdır<sup>32</sup>. Vitrifikasyonda kriyoprotektanların dondurma işlemi buz oluşumunu baskılamaları en önemli unsurdur ve sıcaklık düştükçe, solüsyon tümüyle viskoz bir hal alarak sonunda camsı bir faza geçmektedir. Farklı kriyoprotektanların suyla oluşturulan solüsyonlarının camsı faz oluşturabilme özelliklerinin değişken olduğu gösterilmiştir. Bunun da nedeninin, her bir kriyoprotektanın vitrifikasyonun gelişmesine yardımcı olmada ya da donmaya olan eğilimi azaltmada, su molekülleri ile olan etkileşimlerindeki farklılık olduğu bildirilmiştir<sup>29,42</sup>.

Pratik soğutma oranlarında vitrifikasyonun sağlanması için kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonlarının (>%30) kullanılması gerektiğinden, ilgili kriyoprotektanların toksisiteyi vitrifikasyonda önemli bir rol oynamaktadır<sup>4</sup>. Yüksek konsantrasyonlardaki kriyoprotektanların toksik etkilerini en aza düşürmek için, ekilibrasyon zamanının kısaltılması, iki aşamalı ekilibrasyon ve toksisiteyi azaltan sükroz, trehaloz, formamid ve rafinoz gibi bazı maddelerin kullanılması salık verilmektedir<sup>42</sup>. Öldürücü buz kristallerinin oluşumunun donma aşamasındakine kıyasla çözünme aşamasında daha hızlı şekillendiği gösterilmiştir<sup>40</sup>. Bu nedenle, embriyoların vitrifikasyondan sonra canlılıklarını sürdürebilmeleri, aynı zamanda, devitrifikasyon sırasında meydana gelebilecek zararların da önlenmesine bağlıdır. Sulu solüsyonlarının dondurma ve çözündürme işlemleri boyunca camsı bir faz şekillendiren 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<sup>42</sup>. Fikol<sup>7</sup>, antifriz proteinler<sup>62</sup> ve sodyum hyaluronat<sup>40</sup> gibi yüksek molekül ağırlıklı maddeler kriyoprotektan solüsyonların vitrifiye olabile

özelliklerini artırır ve çözündürme sürecinde devitrifikasyonu önlerler. Ancak, *in vitro* üretilmiş sığır blastosistleri etilen glikol-sükroz solüsyonuyla, herhangi bir vitrifikasyon özelliğini artırıcı madde kullanılmadan başarıyla vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmuştur. 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 olgusunun çözündürme sonrası embriyoların canlılıklarını korumada olumsuz etki göstermediği bildirilmiştir<sup>40</sup>. Farelerde yapılan başka bir çalışmada, dondurma aşamasında vitrifikasyon solüsyonunda şekillenen kristalizasyonun embriyolara zarar vermediği bildirilmiştir<sup>27</sup>. Bu nedenle, dondurma aşamasındaki gözlenebilir kristalizasyon ve çözündürme aşamasındaki yeniden şekillenen kristalizasyonun embriyolara zarsız olması, buz kristallerinin hücre dışında şekillendiğinin ve embriyoların içerisinde herhangi bir kristalleşmenin ya da değişikliğin olmadığını göstergesi olarak kabul edilmektedir<sup>42</sup>. Tartışmalı da olsa, başarı ile gerçekleştirilen dondurma yöntemlerinin hemen tümünde vitrifikasyonun bir dereceye kadar embriyo ya da oositlerin içinde ve etrafındaki solüsyonların konsantrasyonuna bağlı olarak aşamalı şekilde gerçekleşen buz formasyonu sonucunda oluştuğu bildirilmiştir<sup>51</sup>. Karışıklığı önlemek için kriyobiyojide embriyolojide vitrifikasyon terimi, biyolojik materyali içeren solüsyonun tümüyle vitriyeye olduğu yöntemler için kullanılmaktadır<sup>58</sup>. Geleneksel yavaş dondurma ile vitrifikasyonla dondurulan evcil hayvan embriyolarının *in vitro* ve *in vivo* gelişim oranlarını karşılaştıran bir çok çalışmada eşit sonuçlar ya da vitrifikasyon lehine sonuçlar bildirilmiştir<sup>1,21,26,38</sup>.

Yukarıda bahsedildiği gibi 0.25 ml'lik payetlerin doğrudan sıvı azot içerisine daldırılmasıyla dakikada 2500°C'lik bir soğuma oranı sağlanabilmektedir. Vitrifikasyon işleminde soğutma oranını artırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. *Drosophila melanogaster* embriyolarının vitrifikasyonunda<sup>34</sup> elektron mikroskop ızgarasının (electron microscope grid) taşıyıcı araç olarak başarıyla kullanılmasının ardından, aynı şekilde sığır oosit ve embriyoları da vitriyeye edilmiştir<sup>43,44</sup>.

Vajta ve arkadaşlarınınca<sup>55</sup> geliştirilen açık çekilmiş payet (open pulled straw, OPS) yöntemi

de bu amaçla geliştirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır<sup>56,57</sup>. 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 kısmın 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 soğutma hızına ulaşılmış ve sıvı azotta dondurma işleminden önce vitrifikasyon solüsyonu içerisinde bekleme süresi bakımından da 30 saniyenin altına inilmiştir. Elde edilen bu avantajlarla yüksek yoğunlukta kriyoprotektanların zararlı etkileri de en aza indirilmiştir. Çözündürme işlemi, payetin ince ucunun direkt olarak embriyo yıkamada kullanılan herhangi bir vasatın içerisine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Aynı yöntem cam pipetlerin çekilmesiyle de başarılı şekilde uygulanmıştır<sup>23</sup>.

Naylon halkalar (nylon loop) protein kristallerinin vitrifikasyonu amacıyla başarı ile kullanılmıştır<sup>45</sup>. Bu yöntem 1999 yılında Lane ve ark.'nın yaptığı iki ayrı çalışmada<sup>24,25</sup> oosit ve embriyoların vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması amacıyla modifiye edilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Yöntemde kullanılan naylon halkalar kriyoviyalin vidalı kapağına monte edilmiştir. Naylon halka kriyoprotektan solüsyon içerisine daldırılarak halkanın iç kısmının solüsyondan oluşan bir filmle kapatılması sağlanmaktadır. Oluşan film üzerine vitrifikasyon solüsyonu içerisine tutulan embriyolar pipet aracılığı ile transfer edilerek filmi oluşturan solüsyon içerisinde oosit veya embriyolar asılı halde kalırlar. Bu şekilde naylon halka direkt sıvı azot içerisine daldırılır. Sıvı azot içerisinde naylon halka kriyoviyal içerisine kalacak şekilde vidalı kısmından kapatılarak vitrifikasyon işlemi tamamlanır. Naylon halka üzerindeki solüsyonun toplam hacmi 1 µl'den daha azdır. Böylesine küçük bir hacimle donma hızı artırılmıştır. Yöntemin en önemli avantajlarından birisi çözündürme sonrası geri kazanım oranının diğer yöntemlere göre yüksek olmasıdır<sup>33,43</sup>.

Dinnyes ve arkadaşlarınınca<sup>12</sup> geliştirilen katı yüzey vitrifikasyonunda (solid surface vitrification, SSV) ise sıvı azot içerisine kısmen batırılmış ve alüminyum folyo ile kaplanmış olan metal

cismin üzerine oositleri içeren 1-2 µl'lik vitrifikasyon solüsyon damlalarının damlatılması ile donma hızı daha da artırılmıştır. Bu yöntemde, diğer vitrifikasyon yöntemlerinden farklı olarak sadece vitrifiye edilecek oosit veya embriyoların içerisinde bulunduğu çok küçük vitrifikasyon solüsyonu soğumaktadır. Oysa diğer yöntemlerde solüsyonu taşıyan plastik ve cam gibi maddeler de soğumakta ve dolayısıyla donma hızını kısmen de olsa olumsuz etkilemektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada<sup>5</sup>, pronükleer dönemdeki fare embriyolarına SSV ile vitrifiye edilip çözündürüldükten sonra pronükleer DNA mikroenjeksiyonu yöntemi ile gen transferi yapılmış ve transfer işlemi sonucunda transgenik yavru fare elde edilmiştir. Bu yöntemle çeşitli hayvanların oosit ve embriyolarının başarı ile dondurulduğu değişik çalışmalarda bildirilmiştir<sup>6,7,13</sup>.

#### **Embriyoların Çözündürülmesi ve Kriyoprotektanların Uzaklaştırılması**

Çözündürme işlemi (thawing veya warming), embriyoları taşıyan payetlerin (straw) veya embriyoları içerisinde bulunduran diğer taşıyıcıların sıvı azottan çıkarıldıktan sonra, genellikle direkt olarak 20 ile 37°C'deki su banyosu içerisine 10-20 saniye süreyle daldırılması suretiyle gerçekleştirilmektedir. Kriyoprotektif maddelerin zararlı etkilerini (ozmotik şok vs.) önlemek için de hızlı bir şekilde bu maddelerin embriyolardan uzaklaştırılması gerekmektedir<sup>2,16,30,41,42</sup>. Kriyoprotektanların uzaklaştırılması için sükröz<sup>10,37</sup>, trehaloz<sup>5</sup> veya galaktoz<sup>20</sup> gibi hücre içine nüfuz edemeyen şekerler kullanılmaktadır. Bu maddelerin ortamda bulunması sonucu kriyoprotektif madde yoğunluk farkından dolayı hücre dışına çıkar. Bu işlem ya tek ya da 3 aşamalı olarak gerçekleştirilmektedir. Tek bir aşamada yapılan kriyoprotektan uzaklaştırılmasında genellikle çözündürme işleminden hemen sonra, payet elle sallanarak solüsyonların karışması sağlanır ve embriyo transfer pipeti içerisine yerleştirilerek embriyoların direkt olarak transferi gerçekleştirilir<sup>14,48</sup>. Çözündürme işleminde, sükrözün 0.5 ile 1 M konsantrasyonun yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir<sup>10,36,37</sup>.

Son yıllarda embriyoların yanı sıra oositlerin dondurulması konusunda da yoğun çalışmalar yapılmaktadır<sup>12,18,33,61</sup>. Ancak, embriyoların dondurulması ile karşılaştırıldığında başarı oranının daha düşük olduğu görülmektedir. Oositlerin dondurulması hem insanlarda uygulanan yardımcı üreme teknikleri hem de ovaryumdan kaynakla-

nan 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<sup>8</sup>. Ayrıca, bilimsel açıdan ise, günümüzde yoğun olarak çalışılmakta olan klonlama çalışmalarında dondurulmuş oositlerin kullanılabilirliği büyük kolaylık sağlayacaktır<sup>12</sup>. Ticari embriyo transferi amaçlı kriyoprezervasyon uygulamalarında geleneksel yavaş dondurma yöntemi günümüzde hala yaygın şekilde kullanılmaktadır<sup>58</sup>.

Sonuç olarak embriyoların dondurulmasına ilişkin çalışmaların ülkemiz açısından da büyük önem taşıdığı açıktır. Özellikle büyükbaş hayvanların ıslah edilmesinde embriyoların dondurulması ve bunların transfer edilmesinin büyük yararlar sağlayacağı gerçeği akıldan çıkarılmamalıdır. Vitrifikasyon yönteminin pahalı ekipmanlar gerektirmemesi ve saha şartlarında dahi kolayca uygulanabilirliği yöntemin önemini uygulamada daha da artırmaktadır.

#### **Kaynaklar**

1. 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* 1998; 50: 129-145.
2. 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, USA, 1994.
3. 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* 1999; 51: 681-687.
4. ARAKAWA T, CARPENTER JF, KITA YA, CROWE JH. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. *Cryobiology* 1990; 27: 401-415.
5. BAĞIŞ H, ODAMAN H, SAĞIRKAYA H, DINNYES A. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2002; 61: 173-179.
6. BAĞIŞ H, SAĞIRKAYA H, DINNYES A. Vitrification of pronuclear stage mouse embryos in microdrops vs. cryotubes and the effect of the sugar

- content of the vitrification solution. *Theriogenology* 2002; 57: 461.
7. BEGIN I, BHATIA B, BALDASSARRE H, DINNYES A, KEEFER CL. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 2003; 59: 1839-1850.
  8. CAMPBELL BK, PICTON HM. Oocyte storage. *Curr. Obstet. Gyn.* 1999; 9: 203-209.
  9. 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* 1997; 48: 43-50.
  10. CSEH S, HORLACHER W, BREM G, CORSELLI J, SEREGI J, SOLT L, BAILEY L. Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions. *Theriogenology* 1999; 52: 103-113.
  11. DATTENA M, PTAK G, LOI P, CAPPAL P. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology* 2000; 53: 1511-1519.
  12. 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. *Biol. Reprod.* 2000; 63: 513-518.
  13. DINNYES A, YANG X, NAGAI T, BAGIS H, LI H, PRESICCE GA, GASPARRINI B, NEGLIA G, WILMUT I. Solid Surface Vitrification (SSV): An efficient method for oocyte and embryo cryopreservation in cattle, pig and mouse. *Cryobiology* 2001; 43: 332.
  14. 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* 1998; 49: 1051-1058.
  15. DUMAN JG. Insects' antifreezes and ice-nucleating agents. *Cryobiology* 1982; 19: 613-627.
  16. EDASHIGE K, ASANO A, AN TZ, KASAI M. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology* 1999; 38: 273-280.
  17. EL-GAYAR M, HOLTZ W. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J. Anim. Sci.* 2001; 79: 2436-2438.
  18. 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* 2000; 54: 119-128.
  19. 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* 1999; 38: 160-164.
  20. 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* 2000; 41: 106-115.
  21. KASAI M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. *Reprod. Med. Biol.* 2002; 1: 1-9.
  22. KASAI M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 1996; 42: 67-75.
  23. 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* 2000; 53: 1817-1826.
  24. LANE M, BAVISTER BD, LYONS EA, FOREST KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat. Biotechnol.* 1999; 17: 1234-1236.
  25. LANE M, SCHOOLCRAFT WB, GARDNER DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.* 1999; 72: 1073-1078.
  26. 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* 1998; 49: 170.
  27. LEIBO SP, ODA K. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Cryolletters* 1993; 14: 133-144.
  28. 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. *Hum Reprod.* 1998; 13: 3165-3168.
  29. MACFARLENE DR, FORSYTH M. Recent insight on the role of cryoprotective agents in vitrification. *Cryobiology* 1990; 27: 345-358.
  30. MARTINEZ AG, DE MATOS DG, FURNUS CC, BROGLIATTI GM. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 1998; 50: 757-767.

31. MARTINEZ AG, MATKOVIC M. Cryopreservation of bovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 1998; 49: 1039-1049.
32. 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. *Anim. Reprod. Sci.* 1989; 19: 117-129.
33. MAVRIDES A, MORROLL D. Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete? *Reprod. Nutr. Dev.* 2002; 42: 73-80.
34. MAZUR P, COLE KW, HALL WH, SCHEUDERS PD, MAHOWALD AP. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. *Science* 1992; 258: 1932-1935.
35. MISUMI K, SUZUKI M, SATO S, SAITO N. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 2003; in press
36. 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* 1998; 50: 1001-1013.
37. NOWSHARI MA, BREM G. The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. *Theriogenology* 2000; 53: 1157-1166.
38. 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* 1998; 49: 173.
39. 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. *Vet. J.* 2000; 159: 282-286.
40. PALASZ AT, ALKEMADE S, MAPLETOFT RJ. Sodium hyaluronate as a substitute for biological protein in bovine and mouse freezing. *Cryobiology* 1993; 30: 172-178.
41. 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* 1997; 47: 865-879.
42. PALASZ AT, MAPLETOFT RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnol. Adv.* 1996; 14: 127-149.
43. 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. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 2838-2843.
44. PARK SP, KIM EY, OH JH, NAM HK, LEE KS, PARK SY, PARK EM, YOON SH, CHUNG KS, LIM JH. Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 1787-1790.
45. PARKIN S, HOPE H. Macromolecular Cryocrystallography: Cooling, mounting, storage and transportation of crystals. *J. Appl. Crystallogr.* 1998; 31: 945-953.
46. POLGE C, SMITH AU, PARKES AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666-667.
47. 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* 1998; 50: 495-506.
48. 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. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 58: 9-22.
49. RALL WF, FAHY GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos. *Nature* 1985; 313: 573-574.
50. RALL WF, MEYER TK. Zona fracture damage and its avoidance during cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology* 1989; 31: 683-692.
51. RALL WF, REID DS, POLGE C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. *Cryobiology* 1984; 21: 106-121.
52. RALL WF. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28: 237-245.
53. SAĞIRKAYA H. Değişik gelişim dönemlerinde bulunan hibrit fare embriyolarının vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması (Doktora Tezi). U.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 2001.
54. 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. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 2827-2832.
55. 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. *Mol. Reprod. Dev.* 1998; 51: 53-58.
56. VAJTA G, LEWIS IM, KUWAYAMA M, GREVE T, CALLESEN H. Sterile application of



- the open pulled straw (OPS) vitrification method. *Cryo-Letters* 1998; 19: 389-392.
57. 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* 1999; 52: 939-948.
58. VAJTA G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61: 357-364.
59. 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. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 1554-1560.
60. 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* 1997; 48: 1071-1084, 1997.
61. VIEIRA AD, MEZZALIRA A, BARBIERI DP, LEHMKUHL RC, RUBIN MIB, VAJTA G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology* 2002; 45: 91-94.
62. WANG JH. A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation. *Cryobiology* 2000; 41: 1-9.
63. WHITTINGHAM DG, LEIBO SP, MAZUR P. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *Science* 1972; 178: 411-414.
64. WILMUT I, ROWSON LEA. The successful low temperature preservation of mouse and cow embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1973; 33: 352-353.