

Sığır embriyolarının klasik ve vitrifikasyon tekniği ile dondurulması

Yunus Çetin Ayhan Baştan

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara, TÜRKİYE

Özet: Son yıllarda sığır embriyoları ticari amaçlı üretilmekte ve uluslararası transferleri gerçekleştirilmektedir. Embriyo dondurma teknolojisi ile üretilen embriyolar ucuz mal olmakta ve genetik potansiyeli korumak amacıyla gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Günümüzde çok sayıda sığır embriyosu in vitro maturasyon, fertilizasyon ve kültür ile yani in vitro olarak üretilmektedir. Avrupa' da ve Amerika' da hem in vitro üretilmiş hem de canlı hayvanlardan elde edilen dondurulmuş embriyoların ulusal ve uluslararası ticareti yapılmaktadır. Bu teknolojinin tam olarak kullanılabilmesi için in vitro üretilen embriyoların sıvı nitrojende saklanması şarttır. Farklı kimyasal yapılara sahip olan Glycerol, Dimetilsülfoksit ve Glycoler sığır embriyolarının dondurulması için yaygın olarak kullanılmaktadır. İn vitro üretilen embriyolar in vivo elde edilenlere oranla düşük sıcaklıklara hassastır. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için geliştirilen vitrifikasyon teknikleri ile in vitro üretilen embriyolarda, klasik tekniklere oranla daha yüksek canlılık oranları elde edilmektedir. Genellikle in vitro üretilen sığır embriyolarının dondurmaya takiben düşük canlılık oranları vermesi bu teknolojinin ticari uygulamasını kısıtlayan en önemli faktörlerdendir. Vitrifikasyon tekniğinin kolay uygulanabilirlik, düşük maliyet, hızlı uygulanması gibi avantajlarına rağmen, günümüzde kullanımı deneysel çalışmalarla sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle ticari olarak embriyo transferi için geleneksel yavaş dondurma tekniği hâlâ tercih edilmektedir. Dondurma çözme prosedürleri, tekniklerin basitleşmesinden ötürü çiftlik koşullarına bile adapte edilebilmektedir. Bu makalede, sığır embriyolarının cryobiolojik özellikleri, farklı dondurma-çözme prosedürleri ve tekniklerinin embriyoların canlılık oranlarına etkileri ortaya konmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Dondurma, Kryoprotektanlar, Sığır embriyoları, Vitrifikasyon.

Cryopreservation of bovine embryos

Abstract: In the last decade, production and international transport of viable/transferable bovine embryos are getting more attention. Embryo cryopreservation technology has been used for many years as a tool to provide genetic resources at low cost. Large numbers of bovine embryos are currently produced by means of in vitro maturation, fertilization, and culture techniques. In Europe and U.S.A., frozen embryos both produced in vitro and in vivo are sold as a commercial good both nationally and internationally. Storage of in vitro derived embryos in liquid nitrogen is essential to make full use of this technology. Glycerol, DMSO and Glycols, which have different biochemical structure, have conventionally been used for the cryopreservation of bovine embryos. However, in vitro derived embryos have been shown to be more sensitive to low temperature than their in vivo counterparts. To overcome this sensitivity, vitrification procedures were modified for in vitro derived embryos to provide higher survival rate than conventional freezing technique. The poor survival of bovine in vitro produced embryos following cryopreservation is a major factor limiting the commercial application of this technologies. Despite of the advantages of the vitrification technique such as easness, low cost and quickness its use is mainly limited to experimental studies. For commercial embryo transfer purposes, the traditional slow-rate freezing has been used. Freezing-thawing procedures adapted to condition of commercial farm breeding, since the technics are getting less complex. In this review, the cryobiological characteristics of bovine embryos, freezing and thawing procedures and survival rates obtained by different technics were described.

Keywords: Cryopreservation, Cryoprotectants, Bovine embryo, Vitrification.

Giriş

Embriyo saklanması amacını uzun veya kısa süreli depolanma sonrasında embriyonun daha sonraki dönemlerde gelişimine devam edebilmesinin sağlanmasıdır. Embriyonik hücreler - 196 °C de çok

uzun süre canlılık yeteneğini muhafaza edebilmektedirler (1). Bununla birlikte nakillerin daha sonra yapılması gerekebileceğinden birkaç aylık saklamaya daha çok ihtiyaç duyulmaktadır. Bazı nedenlerden dolayı uzun süre saklama yerine buzdolabı

sıcaklıklarında kısa süreli depolamalar da yapılabilmektedir. Genetik olarak değerli embriyoların daha verimli kullanılabilmesi, düşük sıcaklıklarda etkili dondurma tekniklerinin gelişimine bağlıdır. Yapılan bir araştırmada transfer edilen 500.000 embriyonun % 50' den fazlasının dondurulup çözülerek nakledildiği belirtilmektedir (2). İn vitro üretilen embriyoların dondurulup çözdürüldükten sonra yapılan nakillerde ortaya çıkan gebelik oranları değişken olmakla birlikte in vivo olanlara göre düşük olmaktadır. Son yıllarda kontrollü dondurma tekniğindeki gelişmelerle gebelik oranları yükseltilebilmişse de in vitro üretilen embriyoların soğuğa ve dondurmaya daha duyarlı oldukları bildirilmektedir (2).

Embriyoların dondurulması embriyo transfer endüstrisinin önemli bir parçasıdır. Bu teknoloji genetik olarak üstün ırkların uluslararası transferine ve ticaretine olanak sağlamaktadır (3). Ayrıca soyu tükenmekte olan ırkların embriyoları dondurulup embriyo bankalarında saklanarak türün devamlılığı sağlanmış olmaktadır (4). Aynı zamanda süperfolikülasyon çalışmaları ile elde edilen çok sayıda embriyo için her zaman yeterli alıcı temin edilemeyebilmektedir. Bu sorunların üstesinden gelinebilmesi için embriyoların dondurularak saklanması zorunluluk haline gelmiştir.

İN-vitro olarak üretilmiş embriyoların dondurma-çözdürme sonrası yüksek oranda canlı kalmaları bu teknolojinin ticari alana taşınabilmesi için gerekli görülmektedir (5, 6). Son araştırma sonuçlarına göre, in vitro embriyolardan yüksek canlılık ve gebelik oranları elde etmek için dondurma tekniklerinde küçük değişiklikler yapmak yerine maturasyon ve kültür tekniklerinin geliştirilmesi gerekmektedir. İn vitro maturasyonu, fertilizasyonu ve kültürü yapılan (IVMFC) embriyoların kültüre edildikleri medium onların yalnızca gelişimini değil aynı zamanda dondurma sonrası canlılık oranlarını da etkilemektedir (6).

İN vitro üretilen yedi ve sekiz günlük sığır blastosistleri %15 FCS (fötal buzağı serumu) içeren PBS içinde 20°C de 48 saate kadar muhafaza edilebilmektedir (7). Saklama süresi 4-6 saati aştığında bu sıcaklıkta belli bir canlılık azalması olmaktadır. Embriyolar 18-24 saat süreyle 20°C de saklandığında canlılıklarını %70.6 oranında korumaktadır (8). Embriyoların soğuğa dayanıklılığı erken gelişme dönemlerinde (morula) daha zayıfken, gelişme dönemi ilerledikçe (blastosist) artmaktadır (7, 9, 10). Sonuçta embriyoların soğuğa karşı hassasiyeti embriyonun gelişme dönemine, ait olduğu türe ve geliştirildiği ortama bağlı olarak değişmektedir (10).

Embriyo dondurma tekniklerini klasik dondurma tekniği, tek basamaklı dondurma tekniği, ultra hızlı dondurma tekniği ve vitrifikasyon olmak üzere 4 grup altında toplamak mümkündür. Klasik dondurma tekniği ve vitrifikasyon ayrı başlıklar halinde incelenecektir.

Tek basamaklı metot, kontrollü dondurma ve çözdürme tekniğinin bir modifikasyonudur. Bu teknikte çözdürme embriyonun dondurulduğu payetler içinde bulunan sulandırma solüsyonları vasıtasıyla yapılmaktadır. Bu tekniğin laboratuvar koşulları çok iyi olmayan yerlerde ve çiftliklerde çözümlenecek embriyolar için uygun bir teknik olacağı düşünülmektedir (7).

Ultra hızlı dondurma tekniği hızlandırılmış bir dondurma yöntemidir. Örnekler 12°C/dak hızında -30°C' ye soğutulduktan sonra sıvı nitrojene daldırılırlar. Ancak bu teknikle dondurulduktan sonra transfer edilen embriyolardan elde edilen gebelik oranları düşüktür. Vitrifikasyonun aksine bu teknikte hücre içinde ve dışında buz oluşumu meydana gelmektedir.

Klasik Dondurma Çözdürme Tekniği ve Kullanılan Malzemeler

Kontrollü dondurmada kullanılan soğutucular embriyo dondurma prosedürünün en pahalı ekipmanıdır. Ticari olarak çok sayıda kontrollü dondurma cihazları piyasada bulunmaktadır. Bu araçlar çeşitli dondurma çözdürme programlarına sahiptirler. Çok pahalı olmaları nedeniyle IVF laboratuvarlarında ucuz olan değişik araçlar da kullanılmaktadır.

Payetler

Embriyoları dondurmada 1985' li yıllarda 0.5, 1 veya 2ml' lik cam ampuller kullanılmış olup (11, 12, 13) bu materyalin hem kullanım zorluğu hem de payetlere göre daha düşük canlılık oranları vermesi gibi dezavantajları vardır. Yaygın olarak 0.25 ml' lik payetler kullanılmaktadır. Payetlerin muhtemel toksik etkileri embriyolar yüklenmeden önce steril mediumla çalkalanarak elimine edilmelidir.

Son zamanlarda elektron mikroskobu ızgaraları da (grid) dondurma konteynırı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu gridler payetlere göre üç kat daha hızlı soğumaya müsaade ettiğinden vitrifikasyon tekniğinde tercih edilmektedir. Bakırdan yapılmış olan gridlerden soğuğa daha hassas olan oositlerin ve drosophila embriyolarının dondurulmasında yararlanılmaktadır. Vitrifikasyon için payetlerin yerine elektron mikroskobu gridlerinin kullanılması sarkma (hatching) dönemindeki IVP embriyolarda yüksek canlılık oranları elde edilmesine neden olmaktadır (14).

Sığır Serum ve BSA (Sığır Serum Albumini)

Dondurma mediumlarındaki proteinlerin (serumlar, BSA, makromoleküller) yararlı etkilerinin nasıl ortaya çıktığı tam olarak bilinmemekle birlikte, sürfaktan özelliklerinden dolayı kullanılmaktadırlar. Ayrıca proteinli serumların düşürdüğü yüzey gerilimi embriyoların birbirlerine, konteynırın duvarına ya da solüsyon yüzeyine yapışmasına engel olmaktadır. Proteinler hücre membranlarını stabilize ederek

dondurma sırasında hücre zarının zarar görmelerini engellemektedir. Fötal buzağı serumu (FCS), yeni doğmuş buzağı serumu (NCS), kastre boğa serumu (SS) veya sığır serum albumini (BSA) gibi farklı kaynaklardan biyolojik proteinler dondurma mediumlarında etkili olarak kullanılmaktadır (15).

Ancak sığır serumunun veya BSA'nın kimyasal olarak belirli makromoleküller (Polyvinyl alcohol (PVA) gibi) ile yer değiştirmesi muhtemel hastalık bulaşma ihtimalinin azaltılması açısından da önemlidir (16). Bu tür bulaşma riskleri araştırmacıları PVA veya sodyum hyaluronate (SH) gibi maddelerin kullanımına itmiştir. PVA olmasa da SH verdiği yüksek canlılık oranları ile son derece ümit vericidir. Ancak SH bir sürfaktan olmaması nedeniyle embriyoların manipulasyonlarında güçlükler ortaya çıkabilmektedir. Bu güçlükler aşıldığında SH biyolojik serumların yerine tercih nedeni olacaktır (15).

Obhoshi ve ark. (17) yaptıkları bir çalışmada BSA (3 mg/ml) ile kültürü yapılmış olan embriyoların FCS (%1-5) ile kültüre edilenlere göre vitrifikasyon sonrası daha yüksek canlılık oranları verdiğini ve bunun blastosistteki hücre sayısı ile ilgili olmadığını ileri sürmüşlerdir. Bu nedenle araştırmacılar BSA'yı, FCS'ye göre daha avantajlı kabul etmektedirler.

Yaygın Olarak Kullanılan Kryoprotektanlar

Embriyo transferi teknolojisinde farklı dondurma teknikleri geliştirilmiş olmakla beraber bu teknolojinin önemli bir parçası da kryoprotektanlardır. Kryoprotektanlar genelde intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki kategori altında incelenmektedir. İntrasellüler kryoprotektanlardan en yaygın kullanılanları dimetilsülfoksit (DMSO) ve glyceroldür. Bu iki madde oldukça düşük moleküler ağırlığa sahip olup embriyonik hücrelere kolayca girebilmektedir. Son yıllarda ethylen glycol de sığır embriyolarının dondurulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ethylen glycol' (EG) ün (62.07) glycerol (92.10), propylen glycol (76.10) ve DMSO (78.13) göre düşük molekül ağırlığı ve yüksek permeabilite gücü nedeniyle tercih sebebi olmuştur. Propylen glycol, ethylene glycol, diethylene glycol gibi kryoprotektanların nispeten toksitelerinin az olmasına rağmen equilibrasyon süresi ile toksitesinin yakından ilgili olduğu bildirilmektedir (18).

Ekstrasellüler kryoprotektanlar büyük moleküllerdir. Daha çok sükröz gibi disakkaridler ve sığır serum albumini (BSA) ile hyaluronik asid (HA) bunlara birer örnektir. Makromoleküllerin soğuktan koruyucu etkileri hakkında çok az şey bilinmekle birlikte çözündürmeden hemen sonra BSA'nın hücre membranlarını koruduğu ve stabilize ettiği ileri sürülmektedir. Antartik balığından elde edilen antifreeze proteinler son yıllarda ekstrasellüler bir kryoprotektan olarak çalışmalarda kullanılmaktadır. Genel bir kural olarak dondurma sırasında tek bir

kryoprotektan yerine kombine kryoprotektanları kullanmak çözündürme sonrası daha yüksek canlılık oranları elde etme açısından avantajlı bulunmaktadır.

Kryoprotektanların koruyucu etkilerinin; hücre içinde donmanın etkilerini azaltması, hücre içi donmanın meydana geldiği sıcaklıkları düşürmesi, hücre membranlarını stabilize etmeleri sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Klasik Yavaş Dondurma Tekniği

Dondurma prensipleri canlı hücreler için aynıdır. Bu sürecin en önemli bölümü suyun donmadan önce hücre içinden uzaklaştırılmasıdır. Dondurma teknikleri üzerine yapılan pekçok araştırmada kryoprotektanların seçimi, yoğunluğu, soğutma ve dondurma oranları, buz oluşumunun uyarılması ve nitrojene daldırma sıcaklıkları, çözündürme ısıları, hızları ve kryoprotektanın uzaklaştırılması teknikleri etraflıca değerlendirilmiş, bu araştırmalarda embriyoların dondurulması için en başarılı teknikler geliştirilmiştir. Bu dondurma teknikleri doğru olarak uygulandığında genel olarak hücrelere zarar vermemektedir.

En yaygın olarak kullanılan dondurma metodlarından biri olan klasik yavaş dondurma tekniği şu şekildedir.

1- Embriyolar oda sıcaklığında 1.4-1.5 M glycerol solüsyonu içerisinde 20 dk bekletilir. Bu dönemde embriyolar geçici bir büzüşme ve takiben normale dönme evresi geçirirler.

2- Payet içinde kryoprotektanın sulandırılabilmesi için 0.25 ml' lik payetlere 6.8 cm uzunluğunda PBS içinde 1M sükröz ve daha sonra 0.8 cm hava bunu takibende 0.8 cm kryoprotektan tekrar 0.8 cm hava bir cm uzunluğunda kryoprotektan içindeki embriyoların üstüne 0.8 cm hava ve tekrar kryoprotektan şeklinde bir sıralama yapılır. Payete çekilen hava kabarcıkları kullanılarak embriyoların dilüsyon solüsyonu ile karışımı engellenir. Payet ısı ile kapatılarak hazır hale getirilir.

3- Payetlerin -7°C' ye soğutulmuş olan ethanol banyosuna nakli yapılır ve 5 dk beklenir.

4- Nitrojende soğutulmuş forcepsler kullanılarak buz oluşumu uyarıldıktan sonra 5 dk daha beklenir.

5- -7°C' den -28°C' ye dakikada 0.3°C olacak şekilde yavaş soğutma uygulanır.

6- -28°C' den -35°C' ye dakikada 0.1°C yavaş soğutmaya tabi tutulur.

7- Payetler -196°C olan sıvı nitrojene daldırılır.

8- Payetler havada 10 sn bekletildikten sonra yaklaşık 20°C olan suda 10 sn daha çözündürülür. Çözünmeden hemen sonra payet sallanarak sükröz ve kryoprotektanın karışması sağlanır. Dilüsyon için 35°C' de üç dk ve 20°C' de 2-5 dk beklenildikten sonra embriyolar payetten PBS içine alınırlar (3).

Koruyucu özelliklerinden dolayı dondurma mediumlarına %15 oranında sığır serumu veya 4mg/ml dozunda BSA ilave edilebilmektedir. Yavaş dondurma sırasında sıcaklık düşüşünün 0.3°C/dk olmasının 0.5°C/dk ya göre daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (19).

Seeding

Seeding dondurma makinesinde 0°C altındaki ısılarda kontrollü olarak buz oluşumunun uyarılması olarak tanımlanmaktadır. Bu sırada embriyonun dışındaki ortam daha önce donmaya başlar bu nedenle ekstraselüler sıvıdaki eriyik konsantrasyonu yükselir. Stoplazmadaki ısı 0°C nin altına düşmesine rağmen plazma membranının buzdan koruyucu etkisinden dolayı donma meydana gelmemektedir. Hücre içindeki ve dışındaki kimyasal potansiyel farkına cevap olarak hücre içindeki su hücre dışına çıkmaya ve burada donmaya başlar. Dondurma işleminin yavaş yapılmasının nedeni, bu dengeleme sürecine olanak sağlamaktır. Aksi takdirde su hücre içinde donacak ve hücrenin ölümüne neden olacaktır. Hücrelerin canlı kalabilmesi için bu yavaş soğutma gerekmele birlikte, memeli hücreleri için yeterli olmamaktadır. Difüzyon yapabilen glycerol gibi koruyucu bir ajana ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ajanlar hem donma öncesinde hem de çözünme sırasında ozmotik basıncı değiştirirler. Çoğu kryoprotektan hücre içine girebilmesine rağmen suyun hücreden çıkış hızına eşit bir hızla giremediklerinden hücrede dehidrasyona ve büzümeye neden olurlar. Bu olay dilüsyon sırasında tersine dönmektedir (20). Dilüsyon mediumundaki su hücre içine hızla girerken hücre içindeki kryoprotektan aynı hızla çıkamamaktadır. Sonuçta, hücrenin şişmesine neden olmaktadır. Bunu önlemek amacıyla dilüsyon mediumlarına permeabilitesi zayıf olan sükroz katılmaktadır. Sükroz suyun hücre içine girişini yavaşlatarak hücrelerin aniden şişmesine engel olmaktadır. Sığır embriyoları hacimlerinin %200 kadar arttığı durumlarda bile canlı kalabilmektedirler (20).

Çözdürme sırasında payetler sıcak suya atılmadan önce 10 saniye oda sıcaklığındaki havada bekletilirse ısı -100°C' ye kadar düşer ve zona pellucida da meydana gelebilecek bir hasarın önüne geçilmiş olur.

İn vivo gelişen yedi günlük sığır embriyolarının kullanıldığı bir çalışmada vitrifikasyon ve klasik yavaş dondurma teknikleri karşılaştırılmış, vitrifikasyon yapılmış (glycerol ile) 393 embriyodan %44.5 gebelik elde edilirken, klasik teknikle dondurulan 335 embriyodan %45.1 gebelik elde edilmiştir. Araştırmacılar çalışmanın sonuçlarına dayanarak vitrifikasyonun ve payet içinde tek basamak dilüsyon tekniğinin gebelik oranlarında önemli bir azalma olmaksızın saha koşullarında uygulanabileceğini ileri sürmüşlerdir (21).

Hasler ve ark. (22) yaptıkları bir çalışmada in vitro olarak üretilmiş 5.525 embriyoyu 1.4M glycerol ve 1.5

ethylene glycol olmak üzere iki farklı kryoprotektan kullanarak dondurmuşlar, çalışmada yedi günlük sığır blastositlerinin diğer dönemlere göre daha iyi dondurulabildikleri ve çözündürme sonrası BRL (Buffalo Rat Liver) hücre kültürü Menezo B2 mediumu ile TCM 199 mediumu arasında canlılık oranları açısından bir fark olmadığını gözlemişlerdir. Ayrıca 1.4M glycerol 1.5M ethylene glycole göre daha başarılı bulunmuştur.

Çözdürme Sonrası Embriyoların Değerlendirilmesi ve Dondurmanın Bazı Sakıncaları

Çözdürme sonrası en çok kullanılan canlılık kriterlerinden birisi büzümüş olan embriyonun yeniden şişmesi ve 24-48 saatlik kültürde gelişimine devam etmesidir. Sığır blastositlerinin uzun süreli kültüründe sarkma, embriyo canlılığının ve normalliğinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir.

Dondurma sonrası embriyo canlılığının göstergelerinden bir tanesi embriyonun bir sonraki gelişim dönemine geçmesidir. İn vitro üretilen embriyolarda glycerol ile yapılan yavaş dondurmadan sonra erken blastositlerden %79 canlılık elde edilirken bu embriyolardan %64 oranında gebelik elde edilebilmiştir. Canlılık ve gebelik oranları arasındaki paralellige bakarak embriyonun bir sonraki döneme geçmesinin güvenilir bir kriter olabileceği bildirilmektedir (23).

Dondurma sonrası embriyo hasarını değerlendirmek amacıyla propidium iodide ve bisbenzimide boyaları kullanılabilmektedir. Propidium iodide hasarlı hücrelere girip DNA' larını boyayarak embriyonik hücrelerde olan hasar ve hasarın karakterini ortaya çıkarılabilmektedir (24).

Dondurma mediumlarında kullanılan FCS (fetal calf serum), yeni doğmuş buzağı serumu (NCS), kastre boğa serumu (SS) veya sığır serum albumini gibi biyolojik kökenli maddelerin virüsler ve diğer patojenleri başka ülkelere taşıma riski bulunmaktadır (15).

Dondurmanın en önemli sakıncalarından birisi çözdürme sonrası embriyolardaki canlılık oranlarında azalmadır. Diğer bir dezavantajı da bazı hastalık etkenlerinin dondurulan embriyolarla başka ülkelere taşınması riskidir. Sığır embriyolarında zona pellucida zarar görmedikçe patojenik ajanların embriyonik hücrelere girişine karşı etkili bir bariyerdir. Bielanski ve ark. (25) yaptıkları çalışmada nispeten küçük bir virüs olan BVDV' nin %30' luk kryoprotektan solüsyonlarında ve düşük sıcaklıklarda canlı kalabildiğini ortaya koymuşlardır. Dondurma öncesinde kryoprotektanların yüksek konsantrasyonları ile muamele edilen virüs ZP' yi geçerek embriyonik hücrelere ulaşamamışsa da ZP üzerinde kalmayı başarabilmiştir. ZP üzerine yapışmış olan virusun basit

yıkama işlemleri ile uzaklaştırılmadığı bildirilmektedir.

Embriyoların Vitrifikasyonu

İn vitro üretilen sığır embriyolarının çözdürme sonrası düşük canlılık oranları vermesi in vitro teknolojilerin ticari olarak uygulanmasını sınırlayan en önemli faktördür. Vitrifikasyon tekniği bu konuda bir umut olarak görülmektedir (26). Ayrıca klasik yavaş dondurma tekniği pahalı olan bilgisayarlı soğutma makinelerine ihtiyaç göstermekte ve dondurma prosedürü 2 saate yakın bir zaman almaktadır (27). Vitrifikasyon bir sıvının donmadan soğuma nedeniyle yoğunluğunun çok yükselmesi sonucunda cam benzeri bir hal alması olarak tanımlanmaktadır. Tekniğin en önemli özeliği buz kristallerinin oluşumunun elimine edilmesidir. Çok hızlı soğutma yapılmasından dolayı +15 °C ile -5 °C arasındaki tehlikeli bölgenin hızla geçilmesine olanak sağlamaktadır. Bu sıcaklıklar lipid kapsayan organellerde soğuk hasarının meydana geldiği derecelerdir. Vitrifikasyonun gerçekleşebilmesi yüksek konsantrasyonlarda kryoprotektan bir ajanı, yüksek soğutma ve ısıtma oranlarını, intrasellüler ve ekstrasellüler kısımların eş zamanlı olarak vitrifiye olmasını gerektirmektedir. Saniyede 107 °C' lik bir soğuma oranında su bile vitrifiye olabilmektedir (27). Vitrifikasyonun en büyük dezavantajı yüksek konsantrasyonlarda kryoprotektan kullanımını gerektirmesidir. Bu durum kryoprotektanın embriyoya toksik etki yapma ihtimalini de beraberinde getirmektedir. Makromoleküllerin ve şekerlerin vitrifikasyon solusyonuna eklenmesi, birden fazla kryoprotektanın kombinasyonu, konsantrasyonların önceden soğutulması ile bu dezavantajın üstesinden gelinebilmektedir. Çözdürme sırasında dondurma aşamasına göre daha fazla buz kristali oluşma eğilimi meydana gelmektedir. Buz oluşumunu engellemek amacıyla polyethylen glycol, ficoll, sodium hyaluronate gibi makromoleküller ile bitkilerden ekstrakte edilen bazı proteinler kullanılmaktadır (28, 29).

Vitrifikasyon Tekniği

Burada anlatılacak olan vitrifikasyon sadece tekniğin anlaşılması amacıyla verilmiştir. Vitrifikasyon için laboratuarlarda farklı kryoprotektanlar, konsantrasyonlar, ısı, katkı maddeleri ve çözdürme teknikleri kullanılmaktadır.

-Embriyolar oda sıcaklığında 10 dk medium I (%10 glycerol + %20 propanediol + PBS) içinde bekletilir.

-Payet ilk olarak 1M sükröz çekildikten sonra, bir hava kabarcığı ve takiben embriyoların içine konacağı medium II (%25 glycerol + %25 propanediol + PBS) çekilir. Embriyolar yerleştirilir. Tekrar hava kabarcığı çekilir ve kalan kısım 1M sükrözle doldurularak kapatılır.

-Sıvı nitrojene atılarak saklanır.

-Çözdürme 20°C' de sükröz solüsyonundaki buz kristalleri ortadan kayboluncaya kadar yapılır.

-Payetin içeriği petri kabına alınır oda sıcaklığında 5 dk beklenir ve PBS ile yıkandıktan sonra ya kültürü yapılır ya da alıcılara transfer edilir (30).

Vitrifikasyon mediumlarına kryoprotektanın embriyoya geçişini azaltmak ve stoplazmik proteinlerin konsantrasyonunu yükselterek vitrifikasyonu kolaylaştırmak için sükröz, dekstroz, trehalose gibi şekerler katılabilmektedir. Bunlar arasında en yaygın kullanılanı sükrözdür (26,31). Pugh ve ark., (26) in vitro üretilmiş 7 günlük blastosist ve compact morulalar ile yaptıkları çalışmada %25 Etylene glycole (EG) ve %25 DMSO dan oluşan vitrifikasyon solüsyonunun uygun bir ikili oluşturduklarını bildirmişlerdir. EG' ün yalnız başına vitrifikasyon için kullanılması yüksek konsantrasyonlarını gerektirmekte ve bu da toksik etki yaratmaktadır. Bu nedenle DMSO gibi daha az difüzyon yapan bir kryoprotektanla kombinasyonu önerilmektedir (32). Benzer şekilde OPS (open pulled straw) adı verilen açık dar payetlerde (yaklaşık hacmi 1 µl) soğutma oranı 20.000 °C/dk kadardır ve vitrifikasyonu kolaylaştırır. Bununla birlikte bu teknikte embriyo direkt nitrojenle temas etmektedir. Bu da embriyoların patojen ajanlarla kontaminasyonu riskini doğurmuştur. Bunu önlemek aynı zamanda da soğuma oranlarını azaltmamak amacıyla normal payetlerin ¼ kalınlığında yeni payetler kullanılmaya başlanmıştır (28).

İn vitro üretilen embriyolar ile gebelik oluştuktan sonra özellikle 90. güne kadar gebeliğin devam ettirilememesi yaygın bir sorundur. Bu embriyonik kayıpların temel nedeninin allantois' in anormal olarak gelişmesi veya 35. güne kadar gelişmemesi olduğu ileri sürülmüştür. Anormal vaskularizasyondan dolayı fetal gelişim de duraksamakta ve fütüs ölmektedir (26). Vitrifikasyon tekniğinin avantajlarına rağmen embriyo transferinde henüz pratik olarak uygulama alanı bulamamıştır. Bunun nedenleri arasında geleneksel dondurma tekniğinin daha kabul edilebilir düzeylerde gebelik oranları vermesi, vitrifikasyon tekniklerinin çok çeşitli olması nedeniyle standart bir tekniğin olmaması, tekniğin 3 dk kadar sürmesine rağmen her payetin dondurulması için ayrı uğraş gerektirmesi ve ekipman üreten şirketlerin ticari kaygılarla böyle bir tekniğe destek vermemesi sayılabilir (28).

Embriyoların -196°C' de yüzyıllar boyunca saklanabileceği ileri sürülmüşse de günümüzde bunu deneysel olarak ispatlamak mümkün değildir. Dondurulmuş sperma da yaklaşık 10 yıl sonra canlılıkta bir azalma meydana gelmekte, aynı durumun embriyolar içinde geçerli olabileceği ileri sürülmektedir (1). Hruska (1) in vivo elde edilmiş 2.232 sığır embriyosunu 1.5 M glycerol kullanarak klasik metotla dondurmuş ve bu embriyoları 1-849 gün arasında değişen sürelerde çözdürerek canlılık oranlarını değerlendirmiş, bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak

birkaç yıla kadar embriyoyu dondurarak bekletmenin canlılık oranlarını etkilemeyeceğini ileri sürmüştür.

Sonuçta embriyoların dondurulması embriyo naklinin bir parçası olarak önemini giderek artırmaktadır. Çözdürme sonrası daha yüksek canlılık ve gebelik oranları veren klasik yavaş dondurma tekniğinin yanı sıra vitrifikasyon tekniği de giderek gelişmekte ve özellikle in vitro üretilen embriyoların dondurulmasında kullanılmaktadır. Embriyoların dondurulması laboratuvarlarda üretilen embriyoların daha etkili kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca embriyo bankalarının kurulması ile soyu tehlike altında bulunan hayvanların gen kaynaklarının korunmasına imkan vermektedir. Ülkemizde olmasa da birçok gelişmiş ülkede dondurulan embriyoların ticareti ve transferi yapılmaktadır.

KAYNAKLAR

- Bielanski A, Sapp T, Lutze-Wallace C, Palasz A: The effect of high concentrations of cryoprotectants on the passage of bovine viral diarrhoea virus through the zona pellucida of in vitro fertilized embryos. *Anim Reprod Sci* 55: 83-90, (1999).
- Fahning ML and Garcia MA: Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 29: 1-18, (1992).
- Farrand GD, Eldsen RP and Seidel GE: Effect of slow cooling end point temperature on survival of frozen bovine embryos. *J Anim Sci* 61(2): 460-465, (1985).
- Gordon I: Laboratory Production of Cattle Embryos, p227, Cab International Colset Pte Ltd, Singapore, (1994).
- Greve T, Avery B and Callesen H: Viability of in vivo and in vitro produced bovine embryos. *Reprod Dom Anim* 28: 164-169, (1993).
- Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ and Stokes JE: Survival of IVF derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* 48: 563-579, (1997).
- Hruska K: The effect of length of cryopreservation on the viability of bovine embryos in a commercial operation. *Theriogenology* 36(3): 477-484, (1991).
- Kaidi S, Langendonck AV, Massip A, Dessy F, Donnay I: Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 52: 515-525, (1999).
- Kojima T, Soma T and Oguri N: Effect of ice nucleation by droplet of immobilized silver iodide on freezing of rabbit and bovine embryos. *Theriogenology* 30(6): 1199-1207, (1988).
- Leibo SP and Loskutoff NM: Cryobiology of in vitro – derived bovine embryos. *Theriogenology* 39: 81-94, (1993).
- Looney CR, Westhusin ME, Bondioli KR: Effect of cooling temperatures on pre-compacted bovine embryos. *Theriogenology* 31(1): 218, (1989).
- Mahmoudzadeh AR, Soom AV, Vlaenderen IV, Kruif AD: A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on in vitro survival of vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 39: 1291-1302, (1993).
- Massip A, Van Der Zwalmen P, Scheffen B and Ectors F: Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Anim Reprod Sci* 19: 117-129, (1989).
- Mazur P, Schneider U: Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophysics* 8: 259-285, (1986).
- Obhoshi S, Etoh T, Sakamoto K, Fujihara N, Yoashida T and Tomogane H: Effects of bovine serum proteins in culture medium on post-warming survival of bovine blastocysts developed in vitro. *Theriogenology* 47: 1237-1243, (1997).
- Palasz A, Alkemade S and Mapletoft RJ: The use of sodium hyaluronate in freezing media for bovine and murine embryos. *Cryobiology* 30: 172-178, (1993).
- Palasz AT, Gustafsson H, Martinez HR, Gusta L, Larsson B and Mapletoft RJ: Vitrification of bovine IVF blastocysts in an ethylene glycol/sucrose and heat-stable plant-extracted proteins. *Theriogenology* 47: 865-879, (1997).
- Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS and Lim JH: Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum Rep* 14(11): 2838-2843, (1999).
- Pavasuthipaisit K, Tocharus C, Thonabulsombat C, Kitiyanant Y: The viability testing of frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 39: 280, (1993).
- Pollard JW and Leibo SP: Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41: 101-106, (1994).
- Pugh PA, Tervit HR, Niemann H: Effects 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* 58: 9-22, (2000).
- Rall WF: Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim Reprod Sci* 28: 237-245, (1992).
- Saha S, Takagi A, Boedino A, Suzuki T: Direct rehydration of in vitro fertilised bovine embryos after vitrification. *Vet Rec* 134: 276-277, (1994).
- Seidel GE, Eldsen RP and Brink Z: Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. *Theriogenology* 33(1): 322, (1990).
- Sommerfeld V and Niemann H: Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 38: 95-105, (1999).
- Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H and Oe M: Pregnancy rate and survival in culture of in vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology* 40: 651-659, (1993).
- Takagi M, Boedino A, Saha S and Suzuki T: Survival rate of frozen –thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. *Cryobiology* 30: 306-312, (1993).
- Vajta G: Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 621: 357-364, (2000).
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H: Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim Reprod Sci* 45: 191-200, (1996).
- Wagtendonk-De Leeuw AM, Daas JHG, Rall WF: Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo Cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology* 48: 1071-1084, (1997).
- William H and Pettit JR: Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules. *Theriogenology* 23(1): 13-16, (1985).
- Yang NS, Duff R, Lu KH, Gordon I and Polge C: Effect of storage temperature and time on the viability of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 35(1): 297, (1991).

Yazışma Adresi:

Arş. Gör. Yunus Çetin
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı
Ankara, TÜRKİYE
e-mail: y Cetin@agri.ankara.edu.tr