

EMBRİOLARIN DONDURULARAK UZUN SÜRE SAKLANMASI (Long -Term Preservation of Frozen Embryos)

Çetin KILIÇOĞLU (*)

LİTERATÜR BİLGİSİ

1949 yılında Polge ve arkadaşlarınınca (30) glyserolün avian spermatozoasının -79 °C derecede dondurulmasında koruyucu etki gösterdiğinin saptanmasından sonra biolojide düşük ısının öneminde büyük bir gelişme olmuştur. Bunun doğal sonucu olarak bu buluş pek çok değişik tip hücre ve dokuların başarılı bir şekilde saklanabileceği düşüncesine götürmüştür. Bugün donmuş doku kültürü, kan, kornea, kartilago ve sperma bankaları biolojik araştırma, klinikler ve hayvan yetiştiriciliğine hizmet vermektedirler. Memeli embriolarının uterusu implante olmadan donörlerden alınarak taşıyıcılara nakledildiklerinde gelişmiş bir bireyin oluşabileceğinin belirlenmesiyle embrio saklanması memeli genetiğinin incelenmesine ve hayvan yetiştiriciliğine önemli ve pratik katkısının farkına varılmıştır. Glyserolün koruyucu etkisinin bulunmasından hemen sonra embrio dondurma girişimlerinin başlamış olması bu uyanışın doğal sonucudur. 1952 yılında Dr. Audrey Smith (38) döllenmiş memeli yumurtalarının düşük derecelerde (-79 ve -196 °C derece) tutulmalarının daha sonraki gelişmelerinde olumsuz etki yaratmayacağını göstermiştir. Döllenmiş bir hücreli tavşan yumurtalarının sadece % 1'inin, % 15'lik glyserollü ortamda dondurulup çözdürülmelerinden sonra, bölünmeye devam etmesine rağmen Dr. Smith tekniğinin geliştirilmesi ile daha başarılı sonuçlar alınabileceğini vurgulamıştır. Ancak bütün bu çabalara rağmen memeli yumurta ve embriolarının düşük ısıda saklanmalarından uzun bir süre başarılı sonuçlar alınamamıştır (40), ancak bu zaman süresi içinde embrioların saklama tekniğine uyarlanabilecek memeli embriolojisi ve düşük ısı biolojisinde büyük gelişmeler olmuştur.

(*) Prof. Dr., A. Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim üyesi

1972 yılında birbirinden ayrı iki çalışmada (46, 53) memeli embriosunun başarılı bir şekilde dondurulduğu bildirilmiştir. Preimplantasyon aşamasında fare embrioları -196 C derecede dondurulmadan etkilenmeksizin kurtulmuşlar ve daha önce -129 C derecede (46) dondurulan embrioların taşıyıcılara transferlerinden de canlı fare yavruları elde edilmiştir. Bu canlı kalış dimethylsulphoxide (DMSO) in koruyucu olarak kullanılmasıyla, oldukça yavaş dondurma (0.2 -2.0 C derece/dakika) ve çözülme ile sağlanmıştır. Bu ilk buluşlar pekçok laboratuvarıda tekrarlanmakta ve teknik inek, koyun, keçi, tavşan ve ratlar gibi diğer memeli embriolarının korunması ve saklanması için uygulanmaktadır (8). Fare embriosunun dondurulmasında kullanılan tekniğin ana hatları diğer türlere örnek olarak alınmıştır.

Buna göre;

1. Embrioları dişi genital kanalından toplama,
2. Soğuktan koruyuculara alıştırma (Equilibrasyon),
3. -5 C derecede vasatta buz kristallerinin oluşturulması (Seeding),
4. -80 C dereceye kadar yavaş yavaş dondurma (0.2 -0.8 C derece/dakika),
5. Sıvı azotta saklanması (-196 C derece),
6. 0 C dereceye kadar yavaş çözülme (4 -25 C derece/dakika),
7. Koruyucuların aşamalı dilusyonu,
8. Son kontrollerin yapılabilmesi için embrioların 37 C derecede kültürü,
9. Embrioların taşıyıcıların genital kanalına nakli,
10. Doğum.

Dondurma işleminde yapılan son çalışmalar embrioların çözülme ve dilusyon aşamalarının daha hızlı yapılması halinde de sağ kalabileceklerini göstermiştir.

Embriolann Donorlardan Toplanması

Ovulasyon ve tohumlamadan sonra belirli bir süre içinde preimplantasyon aşamasında olan embriolar (1 hücreden blastocyte kadar) oviduct veya uterusun yıkanmasıyla toplanırlar (2, 6, 7). Östrus ve ovulasyonun istenen zamana göre planlanması sinkronizasyon, ovaryumlarda normalden fazla sayıda oocytleri geliştirerek çok sayıda ovulasyonun oluşturulması da süperovulasyon çeşitli hormonların uygulanması ile sağlanır (15).

Östrüs sinkronizasyonu progesteronları içeren vaginal tamponların özel yöntemlerle yerleştirilmesi, progesteron hormon enjeksiyonları veya analoglarının enjeksiyonları ile yapılmaktadır (15).

Süperovulasyonda ise gonadotropik hormonların (Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin, PMSG, ve Human Chorionic Gonadotrophin, HCG) dişiye uygulanması sonu hem çiftlik ve hem de laboratuvar hayvanlarında serbest hale geçen ovum sayısı hemen hemen on katına çıkarılabilmektedir. Hormon uygulayarak tohumlanan ve doğal tohumlanan dişilerden elde edilen embrioların transfer sonu viabilitelerinin birbirlerinden farklı olma-

dığı vurgulanmaktadır (2, 12), ayrıca bugüne kadar yapılan çalışmalarda da süperovulasyonla elde edilen embrioların dondurma ve çözülme işlemlerine karşı doğal olanlardan da hassas olduklarına dair hiçbir bilgi yoktur (48). Hormon uygulamasının dezavantajlarından biri ve hemen hemen en önemlisi değişik tür ve ırkların gonadotropinlere gösterdikleri farklı tepkidir. Bazı dişiler bu uygulamadan etkilenmezlerken diğerlerinde çok sayıda ovulasyon oluşabilmektedir. Diğer taraftan ovaryumların hiperstimulasyonu ile oluşan çok fazla östrojenik hormon konsantrasyonu spermatozoonların dişi genital kanal içerisinde ilerlemelerini de güçleştirmektedir (2).

Embrioların Toplanması ve Korunmasında Kullanılan Vasatlar

Embrioların toplanmasında kullanılan vasatın pH sı 7.2 - 7.4 arasında (10) ve osmotik basıncı 300 mOsm. olmalıdır. Bu amaçla bovin serum albumin, pyruvat ve glikozla zenginleştirilmiş fosfat buffer kullanılmakta ve bu vasat genellikle PBI olarak anılmaktadır (17, 41). Besleyicilerin varlığı oda ısısında tutuldukları süre içerisinde embrionun içindeki metabolik birikimlerin devamında rol oynamaktadır. Buna ek olarak albumin membran koruyucu olarak etkimekte ve embrionun plastik ve cam eşyaya yapışmasını önlemektedir. PBI vasatı sadece morula ve blastocyt gibi ileri preimplantasyon aşaması hücrelerinin kültürde belirli bir süre (24 saat kadar) gelişmelerine yardımcıdır (51).

Embrionik Aşamalar

Fertilizasyondan implantasyona kadar embrio dişinin genital kanalında serbest olarak bulunur. Sadece bu aşamada embriolar dişi genital kanalından toplanarak doğuma kadar gelişip yaşayabileceği aynı türden diğer bir hayvana transfer edilirler. Farede preimplantasyon aşamasının her döneminde dondurulan embriolar transfer edilmelerinin sonunda canlı yavru elde edilmiştir (42, 46). Ancak pratik açıdan düşük ısıda saklamada en uygun aşama embrio 8 blastomerli olduğundadır. 8 hücreli embriolar oviducttan kolayca toplanabilirler, erken embrionik anormaliteler bu aşamada farkedilebilir ve dondurma - çözülme işlemleri blastocyte göre daha az komplikedir. Diğer bir husus da eğer embrionun bir veya iki blastomeri zarar gördüyse bile bu aşamada embrionun gelişip yavru olabilme şansı vardır.

Bazı hayvanların embrioları 0 C dereceye soğutulmaya hassas olduklarından ancak belirli gelişim aşamalarında dondurulabilirler. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda domuz embriosunun blastocyst aşaması dışında + 15 °C nin altında canlılığını koruyamadığı ancak blastocyst aşamasında (6. gün sonuna doğru) domuz embriolarının düşük ısıya oldukça dayanıklılık gösterdikleri belirlenmiştir (51). Koyunda morulae aşaması öncesi (ortalama 32 hücre) ve inekte blastocyst aşaması öncesi (64 -128 hücreli) embriolar 0 C dereceye düşürüldüklerinde etkilenmişlerdir (4, 29, 51) ancak her iki türün embrioları daha ileri aşamalarda başarılı bir şekilde dondurulmuşlardır.

Soğuktan Koruyucular ve Dondurma öncesi Koruyucuların Vasata Karıştırılması

İlk defa glyserolun spermatozoonu soğuşun zararlı etkisinden koruma özelliği saptandıktan sonra DMSO, ethylen glycol, sucrose, polyvinylpyrrolidone (PVP), hydroxyethyl nişasta ve bazı proteinler gibi benzer koruyucu özellikleri olan pek çok madde bulunmuştur. Soğuktan koruyucular gerek permeable (DMSO, glycerol ve ethylene glycol) olsun veya gerekse non-permeable (PVP, Sucrose) olsun genellikle dondurma esnasında su donarken external vasatta şekillenen yüksek konsantrasyondaki erimiş maddelerin oluşturduğu zararlı etkilerden hücreleri korudukları kabul edilmektedir (23). Bununla beraber koruyucuların hücreleri düşük derecelerin zarar verici etkilerinden nasıl koruduğu tam olarak açıklanamamaktadır. Yukarıda belirlenen bütün bu maddelerin hücreleri soğuktan koruma özellikleri de aynı değildir. Şöyleki DMSO glycerol ve ethylene glycol embrioları soğuşun zararlı etkisinden yeteri kadar koruyabilmektedir ancak bazı araştırmacılar bu üç koruyucudan en etkilisinin DMSO (40) diğer bazıları ise glycerol olduğunu (51) ifade etmektedirler.

Diğer hücre tiplerinde olduğu gibi embrioların viabiliteleri koruyucunun konsantrasyonuna olduğu kadar karıştırılma hızına, ısısına ve dondurma öncesi koruyucunun uygulanma süresinden etkilenirler. Fare embrioları ile en başarılı sonuçlar DMSO in 1 ve 2 M arasında değişen konsantrasyonlarından elde edilmiştir (46, 54) ancak pratikte 1.5 M en uygun konsantrasyon olarak kabul edilmektedir. Diğer türlerde optimal konsantrasyon 1.5 ile 2.0 M arasındadır.

Belirlenen konsantrasyondaki DMSO in morulae aşamasına kadar olan fare (46), rat (43) ve tavşan (1) embriolarına bir defada ve süratle katılabilir ve bu husus çözülme sonu embrioların yaşama oranlarında negatif bir etki oluşturmamaktadır. Ancak koyun, inek (50), fare (41) gibi bazı türlerde blastocystlerin yaşama şansının DMSO in yavaş katılmasıyla arttığı bildirilmiştir. Olasılıkla DMSO in tek seferde ve hızla katılmasıyla oluşan osmotik basınca blastocyst dayanmamaktadır.

Embrioların dondurulmasında kullanılan koruyucular hücrelerin içine girebilirler ve koruma için girmesi istenen miktar dondurma öncesi ısı ve uygulama süresi ile düzenlenmektedir. Ancak şurası da unutulmamalıdır ki gelişmenin çeşitli aşamalarında değişik tür embrioların permeabilite karakteristiklerinde gösterdikleri farklılıkların da bu olguda etkisi vardır. DMSO ve ethylene glycol glycerolden daha kolayca hücre içine girebilirler. 8 hücreli fare embrioları ile 0 C derecede DMSO de sadece 5 dakika bırakılmalarıyla optimal viabilite elde edilmişken (17) glyserol ile benzer sonuçların alınabilmesi için daha uzun bir sürenin geçmesi gerekmiştir (14). 8 hücreli tavşan embriolarında yaşama oranı, 0 C derecede DMSO te tutulma süresinin 1 dakikadan 30 dakikaya çıkartılmasından sonra % 0 dan % 55 e artma oluşurken tavşan morulaelarında ise hafif bir artma gözlenmiştir (1). Bu husus ya morulae aşamasının DMSO e daha geçirgen olmasından ya da morulae

aşamasında hücre büyüklüğünde azalma nedeniyle intraselüler DMSO konsantrasyonuna daha çabuk ulaşması şeklinde açıklanabilmektedir. İleri morulae ve blastocyst aşamasında olan embriolar 0 C derecenin üstünde DMSO da daha uzun süre tutulmalıdırlar. Koyun ve inek embriolarının oda ısısında, yavaş yavaş karıştırılması da hesaplanmak suretiyle, DMSO de kalma süreleri 40 dakika veya daha fazladır (49). Bunun için değişik yöntemler kullanılmış olmakla beraber inek blastocystlerinin dondurulmasında PMI içerisindeki koruyucular 25 C derecede DMSO 1.5 Ma, 35 C derecede glycerol 1.0 Ma 6 aşamada getirilmişlerdi. Koruyucular istenen konsantrasyona ulaştıktan sonra dondurmadan önce 35 C derecede DMSO da 20 dakika, glyserolde 60 dakika tutulmuşlardır (4). Ancak DMSO de bu uzun kalma sürelerinin hücrenin içindekilerini ve boşluğu çevreleyen trophoblast hücre sıralarını koruyabilmesi için DMSO in blastocoel boşluğuna girmesinin gerekli olup olmadığı bilinmemektedir. İleri morulae aşamasından itibaren dış trophoblast hücreleri arasında sıkı bağ kompleksleri şekillenmekte (3) bunlar da DMSO in hücreler arası boşluklardan basit diffuzyonla iç hücrelere erişmesini önlemekte ve bu nedenle hücre içine erişebilmesi için gereken zaman da uzamaktadır.

Çözülmeden Sonra Koruyucuların Dilusyonu

Genellikle osmotik basınca bağlı zararı azaltmak için çözülmeden sonra koruyucular vasattan, hücrenin osmotik erimesini önlemek için yavaş yavaş uzaklaştırılmalıdırlar (51). 1.5 M DMSO içeren bir solusyonun 1.5 osmol veya daha fazla osmotik basıncı vardır ve dilusyonla bu miktar 0.3 osmol olan normal fizyolojik düzeye indirilmelidir. Dilusyon esnasındaki hücre şişmesinin derecesi hücre içindeki koruyucunun miktarına ve hücreden dışarıya atılmadaki hızına bağlıdır. Isı koruyucunun karıştırılmasında olduğu kadar hücreden atılmasında da etkilidir. Pek çok olguda çözülmeden sonra DMSO hücreden, osmotik basıncın stresinden kurtulmak için, ya 0 C derecede fare (46), rat (22) ya 20 C derecede fare (53), inek (54), koyun (7) veya 37 C derecede fare (50), tavşan (1) dilüe edilmişlerdir. Osmotik şokun etkisini azaltmak için daha pek çok yaklaşımda bulunulmuştur. DMSO 8 hücreli tavşan embriolarından vasatın osmotik gücü yavaş yavaş azaltılarak uzaklaştırılmıştır (1) ve diğer bir çalışmada da DMSO in embriolardan yavaş yavaş diffuzyonunu sağlamak için çözülmeden hemen sonra fare embrioları 30 dakika izotonik sucrose da tutulmuşlardır (18). Bununla beraber bazı hücre sistemleri osmotik stresleri dilusyonun ısısı oda derecesi veya üstü olduğunda tolere edebilmektedirler (39, 55). Yaşama oranı açısından DMSO in 20 C derecede çabuk dilusyonu sonu ile hem 0 C derecede ve hem de 20 C derecede yavaş dilusyonu sonu benzer sonuçları vermişlerdir. Olasılıkla tolere edilebilecek osmotik stress dondurma ve çözülme sırasında embrioda oluşan zarara bağlıdır.

Isının Düşürülmesi Sırasında Vasatta Buz Odaklarının Oluşturulması

İçerisinde embrioların bulunduğu vasatın donma noktası içerdiği koruyucunun konsantrasyonuna göre değişebilir. 1.0, 1.5 ve 2.0 M DMSO içeren PBI vasatının donma noktaları sırasıyla ortalama -2.5, -3.5 ve -4.5 C derecedir. Yavaş yavaş dondurulduklarında bu vasatlarda vasatın donma noktasında buz odakları nadiren oluşur ve vasat

-21 C dereceye kadar beklenenin, istenenin altında soğur. Bu aşırı soğumanın olduğu vasatta buz oluştuktan sonra da embrioların dondurulmağa devam edilmesi halinde ise yaşamları ciddi şekilde etkilenir. 8 hücreli fare embrioları 0.5°C/dakikada soğutulduklarında yaşama şansları içinde buldukları vasat -7 C derece ise azalmakta, -12 C derece veya altı olduğunda da hiç bulunmamaktadır (44). Buz oluşmasında kaynaşmanın latent ısısı embrionun içinde bulunduğu örnekte vasatın erime noktasına yakın bir ısıya yükselmesine neden olmakta aynı zamanda vasatın içinde bulunduğu ortamın ısısı devamlı olarak belirli bir hızda düşmektedir ve bu nedenle buz oluşmasından hemen sonra soğutma kabini ile örnek arasında ısı farkı doğmakta ve embrionun yaşamı için gerekli optimal ısı azalmasından hızlı, soğutma kabinindeki ile eşdeğerde ısı şekilleninceye kadar, vasatta ısı düşmesine neden olmaktadır. Ancak -5 C derece ve -12 C derecede buz kristalleri (Seeding) oluşturulan embriolarda ortalama 2 °C/dakika ve 6 °C/dakika hızda ısı azalması şekillenmektedir. - 12 C derecede buz odağı oluşturulan embriolar soğutma kabinindeki ısıya düşürüldüklerinden sonra çözdürüldüklerinde hala canlıdır ancak buz odağı oluşturulmasından hemen sonra hızlı ısı düşüşünü önlemek için başka bir soğutma kabinine nakledilmedikçe -80 C dereceye kadar yavaş yavaş dondurulduklarında ve sıvı azota nakledildiklerinde ölürlür. Embrionun canlılığı dondurma sırasında vasattaki su donarken artan konsantrasyonda eriyik içi maddelere tepki olarak şekillenen dehidrasyon miktarına bağlıdır. Aşırı soğutulmuş örnekler buz şekilleninceye kadar dehidrasyon yapmamakta ve netice olarak buz oluşmasından sonra aynı soğutma kabininde kaldıkları takdirde hücre içi buzun şekillendiği dereceye gelmeden önce embrioların dehidrasyonu için zaman yetmemektedir.

Pratikte yüksek derecelerde dondurmalarda oluşabilecek zararı önlemek için embriolar, soğuktan koruyucularla equilibrasyondan sonra, vasatın donma noktasının birkaç derece altındaki sabit ısıdaki banyolara (seeding bath) konulmalıdırlar. Bir kaç dakika sonra örneklerde aşağıda belirlenen yöntemlerden biri ile buz kristalleri (seeding) oluşturulmaktadır.

1.Vasatın yüzeyine ya içinde buz bulunan pastör pipeti ile veya daha önce sıvı azotta dondurulmuş tel ile dokunulur.

2.Embrioları içeren ampulün dışına kuru buz veya soğuk metal çubukla dokunulur.

3.Örneklere hızla vurulur (Bu yöntemin başarılı olabilmesi için banyo ısısının vasatın donma noktasından 4 C derece daha düşük olması gerekmektedir).

1 ve 2 nolu yöntemlerle buz kristallerinin oluşturulmasından sonra örnekler banyo ısısı ile aynı derecede olan dondurma kabinine konulmadan önce reequilibre olabilmeleri için sabit derecedeki banyoda (seeding -bath) 5 dakika tutulmalıdırlar. 3 nolu yöntemle buz kristalleri oluşturulan örnekler kristalleşmeden sonra daha fazla ısı düşmesini önlemek için hemen vasatın donma noktasının ortalama 1 derece altında olan dondurma kabi-

nine konulmalıdırlar. Günümüzde programlanabilir derin dondurucularla embriolar dondurulmaktadır. Ancak bu tip cihazlarda, dondurma kabınınin uygun olmasına karşın, buz kristalleri otomatik olarak yapılamamaktadır. Buz kristallerinin oluşturulması için dondurma kabini açılmakta ve kabinde ısı değişikliği şekillenmektedir ki bu da embrioların dondurulmasında ciddi bir sakınca olarak görülmektedir (13).

Dondurma ve Çözülmenin Hızı

Uygun olan koruyucunun seçimi dışında memeli embriolarının düşük ısıda saklanmasında rol oynayan iki çok önemli faktör de embrioların dondurulmaları ve çözümleri esnasında uygulanan ısıların hızıdır. Fare embriolarında viabilite DMSO in koruyucu olarak kullanılması yanısıra yavaş dondurma (0.2 - 2.0 °C/dakika) ve yavaş çözülme (4 - 25 °C/dakika) ile başarılmıştır. -196 C derecede saklanan 8 hücreli fare embriolarının viabiliteleri için gerekli bu yavaş ısı hızı için kritik sınırlar dondurmada -4 - -60 C derece ve çözülmede -70. -20 °C aralarında (17, 24).

Dondurma

Memeli embrioları diğer pek çok hücre tiplerinde de gösterildiği gibi dondurma işlemine aynı tepkiyi göstermezler (10, 16, 25, 32). Genellikle donma esnasında intraselüler buzun oluşmasının çözülmede hücrenin ölümüne neden olduğuna inanılmaktadır. Hücrenin etkilenişi ya çözülme sırasında buzun tekrar kristalleşmesiyle (22) veya buzun erimesiyle hücrede artan osmotik basınç nedeniyle (9). Isının düşürülmesi sırasında vasattaki su an ve an donarken eriyikteki maddelerin artan konsantrasyonuna karşılık hücredeki su dışarıya doğru hareketlenir. Dondurma hızı oldukça fazla ise donma derecesine gelinip hücrelerin içi donduğunda yeteri kadar su dışarı atılamaz bu nedenle intraselüler buz oluşmasını sınırlandırmak veya önlemek için dondurma hızı dehidrasyonun oluşabilmesi için yeterli zaman sağlamalıdır. Her hücre için dehidrasyon hızı, hücrenin volumüne, hücrenin yüzeyinin genişliğine, suyu geçirgenliğine ve bu permeabilitenin ısıyla olan ilişkisine bağlıdır. Oluşabilecek dehidrasyonun tamamı hücre donduğundaki ısıya da bağlıdır.

Fare embrioları için seçilen dondurma hızları gerçekte Mazur (21) tarafından deniz kirpisi yumurtaları için daha önce oluşturulan hesaplamalara dayandırılmıştır. Bu hesaplamalarda embrioların 1 °C/dakika veya daha yukarıda dondurulmalarıyla hücre içi buzun oluşacağı belirtilmişse de fare embrioları 2 °C/dakika da dondurulduklarında yaşayabilmiş ancak 7 °C/dakika ve daha hızlı dondurulmalarında hiç biri sağ kalmamıştır.

Preimplantasyon gelişme esnasında fare embriosu, embrionun total protein içeriği (ortalama % 25 azalma) ve 64 -128 hücre içeren blastocyst oluşturmak için yumurta bölünürken bireysel embrionik hücrelerin büyüklüklerinde azalma olduğundan, dondurma hızına hassasiyet göstermez. Embrio preimplantasyon süresi boyunca ufak bir organ veya bir doku parçası gibi tek bir kitle olarak tepki göstermektedir. Kırmızı hücrelerin kümeleşmesinde iç taraftaki hücrelerden atılan suyun dıştaki hücrelerin arkasına aktığı gösterilmiştir (19), bu husus preimplantasyon esnasında embrioların optimal dondurma hızının

neden değişmediğinin bir açıklaması olarak düşünülmektedir (2). İleri morulae ve erken blastocystde hücre içinden su hareketleri dış throphoblast hücreleri ile şekillenen sıkı bağ kompleksleri nedeniyle de kısıtlanabilmektedir (3). Fare embriosu bu kavramların incelenmesi için en uygun ortam ve modeldir.

Bugüne kadar incelenen bütün memeli embriolarının optimal dondurma hızı 1 hücreli ovum büyüklüğünde önemli değişiklikler olmasına rağmen (farenininkinin çapı 70 µ, ratın 70 µ, tavşanın 70 µ, koyun ve ineğin 140 µ) birbirlerine benzer. Optimal dondurma hızında değişikliğin olmaması farklı türlerin embrionik hücreleri arasında su geçirgenliği karakteristiklerindeki farkı veya intraselüler buz kristallerinin oluştuğu zamanki ısı farkını yansıtır.

Pek çok çalışmada embriolar, saklamak amacı ile doğrudan sıvı azota transfer edilmeden önce, -60 C derece veya daha aşağı derecelere kadar yavaş yavaş dondurulmuşlardır.

Çözülme

İntraselüler buz şekillenme olasılığını minimize etmek için en uygun dondurma hızı seçmenin dışında en önemli faktör başarılı olarak dondurulmuş embrioların çözülme hızına gösterdikleri hassasiyettir (46, 53). Fare embriolarının optimal viabiliteleri 4 -25 °C/dakika arasındaki çözülme hızı ile başarılmıştır. İlk zamanlar yavaş yöntemle dondurulan memeli hücrelerinin diğer tiplerinin yaşamları için çözülme hızının istendiği gibi uygulanabileceğine inanılıyordu, ancak yapılan ilk çalışmalardan birinde yavaş dondurulan (0.3 °C/dakika) insan kırmızı hücrelerinin yavaş çözülmede hızlı çözülmeden daha az hemolisis gösterdikleri bildirilmiştir (27) ve o zamandan beri bu bulgu diğer bazı araştırmacılarca da desteklenmiştir (28, 33). İntraselüler buz bulunmadığında hızlı osmotik değişiklikler tarafından bozulmuş olan embrio için subselüler yapıların tekrar oluşması için gerekli yavaş rehibrasyon dışında yavaş yavaş dondurulmuş embrioların hızlı çözülmesinin neden öldürücü olduğunu açıklamak çok zordur.

Kırmızı kan hücreleri gibi bazı hücre tiplerinin az miktarda hücre içi buz bulunması ve hızlı yöntemle çözümleri halinde intraselüler buzun kritik miktarı aşmadığı ve hücrelerin yaşamlarına devam ettikleri bilinmektedir (11, 37). Son zamanlara kadar memeli embriolarının hızla eritilmesi dondurma hızı ne olursa olsun yaşamları için zararlı olduğu düşünülmekteydi. Gerçi fare embrioları ile son çalışmalar 8 hücreli embrio (46) ve blastocystlerin (53) düşük bir yüzdesinin (ortalama % 10) 1 ve 10 °C/dakika arasındaki hızda dondurulduklarında hızlı çözülme (360 -450 °C/dakika) sonu sağ kalabileceklerini göstermiştir. İneğin blastocystünün ilk başarılı saklanması yavaş dondurma (0.22 °C/dak.) ve çabuk çözdürülmeleri ile elde edilmiştir ancak canlı embrioların miktarı yine % 10 dan az bulunmuştur (54). Olasılıkla bu olguda çok az intraselüler buz şekillenmiş olupta hızlı çözdürülme sonu sağ kalanlar da vardır. Memeli embriolarının hızlı çözdürülmeleri sonu sağ kalabilecekleri koyun ve inek embrioları ile Willadsen ve Polge (31, 50, 52) tarafından

gösterilmiştir. Yavaş dondurma (0.3 °C/dakika) -30 ve -36 C dereceler arasında sona erip sıvı azota direk konulmalarından sonra embrioların yavaş yöntemde ölüp, hızlı çözülmeden sağ olarak çıkabileceklerini ortaya koymuşlardır.

Whittingham ve arkadaşları (49) hızlı çözülmenin fare embrioları üzerine etkisini incelemişlerdir. Buz kristallerinin oluşturulmasından ve yavaş dondurmadan sonra, -10 ve -80 C derece arasında embriolar doğrudan sıvı azota aktarılmışlardır. Embrioların hızlı çözülmeden ancak, yavaş dondurmanın oldukça yüksek derecelerde (-10 dan -15 °C) kesilmesinden sonra sağ kalabildiklerini saptamışlardır. 8 hücreli embrioların hızlı çözülmede en yüksek yaşama oranı -35 ve -40 C derecelerden (% 72.80) ve hızla çözdürülen blastocystlerden -25 den -50 C derecelerden (% 69 -74) sonra sıvı azota geçirilmeleriyle elde edilmişlerdir. Buna karşın embrioların yavaş çözülmede sağ kalabilmeleri için -196 C dereceye nakledilmeden önce -60 °C veya daha düşük derecelere kadar yavaş yavaş dondurulmaları gerekmektedir. Bu sonuçlar sıfırın altındaki yüksek derecelerden sıvı azota geçirilen embriolarda intraselüler buzun oluştuğu, yaşamın ancak hızlı çözülmekle sağlanabileceği gerçeği vurgulanmaktadır.

Hızla çözdürülen blastocystün yaşamı için optimal sınırlar 8 hücreli embriodan daha fazladır şöyleki blastocystün daha ufak olan hücreleri daha hızlı dehidre olabilmekte ve hızla çözdürüldüklerinde rehidrasyon sırasında daha az osmotik basınca maruz kalmaktadırlar.

Belirli şartlar altında dondurulup hem yavaş ve hem de hızlı çözdürüldüklerinde memeli embriolarının yaşamları ve işlemlere gösterdikleri tepki diğer memeli hücrelerininkinen benzerdir. Pratik olarak memeli embriolarının saklama işlemi, embriolar sıfırın altında oldukça yüksek derecelere kadar yavaş dondurulup ve hızla çözdürüldüklerinde daha çabuk ve basit olmaktadır.

Saklamamanın Süresi

Teorikman hücreler biyolojik aktivitenin olmadığı derecelerde dondurulabildiklerinde canlılıklarının askıya alındığı durumlarda kalabilmektedirler. -196 C derecedeki sıvı azot bu durumu sağlayabilmektedir çünkü bu derecede yer alan tek reaksiyon iyonize edici radyasyon gibi fotofiziksel olgulardır (20). Bu tip radyasyon genetik zarara neden olabilmektedir. Diğer taraftan -196 C derecede saklama sırasında bu zararı ortadan kaldıracak enzimatik mekanizma da bu aşamada etkin olmadığından zararda birikim oluşacağı belirtilmektedir. Saklamada radyasyona karşı az da olsa koruma DMSO, düşük ısı ve cam ampullerle sağlanmaktadır. Böylece -196 C derecede memeli embriolarının uzun süre saklanmasında belirgin bir sakınca bu güne kadar saptanamamıştır.

Canlılık Kontrolleri

Gerçekte dondurulup çözdürülmüş embrioların canlılıklarını saptamak için en uygun yöntem taşıyıcılara transferden sonra canlı yavruların elde edilmesidir. Fakat saklamadan sonraki canlılığın saptanması için uygun bir in vitro deney bazı memeli türlerinde

gebelik süresinin uzun olması nedeniyle daha avantajlıdır. Fare embriolarının canlılığının saptanması için yapılan deney, dondurulup çözdürülmüş embrioların blastocyst aşamasına kadar gelişenlerin % sinin aynı aşamaya kadar gelişen dondurulmamış kontrollerin yüzdesine oranıdır. Farede 1. Elde edilmesinden hemen sonra morfolojikman normal görünen, 2. Kültürde blastocyst aşamasına kadar gelişmeğe devam eden, 3. in vivo bir canlı yavru olup büyümeğe devam eden dondurulup çözdürülmüş embriolar arasında yüksek bir korelasyon vardır (13, 45, 47, 48, 50). Diğer türlerde örneğin inek ve koyunda embrioların uzun bir süre kültürde tutulması farede olduğu gibi başarılı sonuçlar vermemektedir. Bununla beraber in vitro bir iki bölünme aşamasının oluşturulması dondurma ve çözüme işlemlerinin başarısı hakkında yeterli bilgi sağlayabilmektedir. Çiftlik hayvanlarında in vitro deneye bir alternatif de embrioları blastocyst aşamasına kadar gelişebileceği tavşan oviductuna transferleridir.

Son zamanlarda diğer memeli hücrelerinin viabilitesini saptamada daha önce kullanılmış olan bir teknik (26) dondurulmuş çözdürülmüş yumurta ve embrioların viabilitesini saptamak için de uygulanmıştır (27). Bu tekniğe göre embrioların çözdürülmelerinden hemen sonra fluorescein'in non-fluorecent derivesi ile karıştırılmaktadır. Hücre içi esterazlarla etkilenen bu maddeden fluorescein serbest hale geçmekte ve plasma membranlarınca tutulmaktadır ancak ölü ve zarar görmüş hücreler fluoresanslarını pek çabuk yitirmektedirler (5, 34, 35, 36).

ÖZET

Bazı türlerin embrioları in vivo olarak bir kaç gün süreyle başarılı bir şekilde korunabilmektedirler. Geçici bir süre için ligatüre edilmiş tavşan oviductuna transfer edilen embriolar kısa süreli embrio saklanması yararlı yöntemlerden biridir. Ancak gerçekte embrioların uzun süreli korunmalarında en geçerli ve pratik yöntem dondurma ve sıvı azotta saklanmasıdır.

Embrioların etkili bir şekilde korunmalarının hayvan yetiştiriciliği açısından yararları pek çoktur. Böylece seleksiyonla elde edilmiş bir hayvan popülasyonunda özel gen veya gen kombinasyonları taşıyan hayvanlar sayıca artar. Ayrıca dondurulmuş olan embrioların, kullanılmadan önce, akrabalarının hastalıklar ve verimleri yönünden kontrolleri yapılabilir.

SUMMARY**Long -term Preservation of Frozen Embryos**

Embryos of some species can be successfully preserved in vivo for several days. Temporary transfer of embryos to the ligated oviduct of rabbit provides an alternative method for short -term preservation. However the only practical method for really long-term preservation of embryos is by deep- freezing and storage in liquid nitrogen.

The effective storage of embryos would provide a lot of possibilities in control of animal breeding. The main means is selection by which animals with desirable traits were preferred and thus special genes, gene combinations are increased in number in a given population. Further, while embryos are stored prior to use, their parents or sibs or both could be tested for disease and for production characteristics.

LİTERATÜR

1. BANK, H., MAURER, R.R. (1974): Experimental Cell Research. 89, 188.
2. BETTERIDGE, K.J. (1977): Embryo Transfer in Farm Animals. 16. Canada Dept. of Agriculture.
3. BIGGERS, J. E., BORLAND, R. M., POWERS, R. D. (1977): 52: The Freezing of Mammalian Embryos. Ciba Foundadion Symposium. Amsterdam, Elsevir.
4. BILTON, R.J. (1980) : 9th Int. Cong. Anim. Reprod. Spain Madrid, Vol II. 245 -253.
5. CHURCH, R.B., RAINES, K. (1980): Theriogenology. Vol 13 No: 1, 91.
6. DANIEL, J.R. (1971): Methods in Mammalian Embriology. San Francisco. Freeman.
7. DANIEL, J.R. (1978): Methods in Mammalian Reproduction. New York and London. Academic Press.
8. ELLIOTT, K., WHELAN, J. (1977): The Freezing of Mammalian Embryos. Ciba Foundadion Symposium 52, Amsterdam, Elsevier.
9. FARRANT, J. (1977): Philosophical Transactions of the Royal Society, London Series B 278, 191.
10. FARRANT, J., KNIGHT, S.C. MORRIS, G.J. (1972): Cryobiology, 9, 516.
11. FARRANT, J., WALTER, C.A., LEE, II., McGANN, L.E. (1977): Cryobiology. 14, 273.

12. GATES, A. H. (1971): *Methods in Mammalian Embriology*. p. 64.
13. HAHN, J. (1980): 9 th Int. Cong. Anim. Reprod. Madrid, Spain Vol II, 263 - 267.
14. JACKOWSKI, S.C. (1977): *Physiological Differences between Fertilized and Unfertilized Mouse Ova: Glycerol Permeability and Freezing Sensitivity*. PhD Dissertation.
15. KILIÇOĞLU, Ç., ALAÇAM, E., İZGÜR, H., TEKELİ, T. (1984): *T. B. T. A. K.*, 73.
16. LEIBO, S.P., FARRANT, J., MAZUR, P., HANNA, M.G., SMITH, L.H. (1970): *Cryobiology*, 6, 315.
17. LEIBO, S.P., MAZUR, P., JACKOWSKI, S.C. (1974): *Experimental Cell Research*. 89, 79.
18. LEIBO, S.P., MAZUR, P. (1978) : *Methods in Mammalian Reproduction*. p. 179.
19. LEVIN, R.L., CRAVALHO, E.G., HUGGINS, C.E. (1977): *Cryobiology*. 14, 549.
20. LYON, M.F., WHITTINGHAM, D.G., GLENISTER, P.H. (1977): *The Freezing of Mammalian Embryos*. p. 273.
21. MAZUR, P. (1963): *Journal of General Physiology*. 47, 347.
22. MAZUR, P. (1966): *Cryobiology*. New York and London. Academic Press.
23. MAZUR, P. (1970): *Science*. 168, 939.
24. MAZUR, P. (1980): 9 th Int. Cong. Anim. Reprod. Madrid. Vol. I, 99 -114.
25. MAZUR, P., FARRANT, J., LEIBO, S.P., CHU, E.H.Y. (1969): *Cryobiology*. 6, 1.
26. McGRATH, J.J., CRAVALHO, E.G., HUGGINS, C.E. (1975): *Cryobiology*, 12, 540.
27. MERYMAN, H.T. (1967): *Cellular injury and Resistance infreezing Organisms*. Sapporo Japan, Hokkaido University. p. 231.
28. MILLER, R.H., MAZUR, P. (1976): *Cryobiology*. 13, 404.
29. POLGE, C. (1977): *The Freezing of Mammalian Embryos Ciba Foundation Symposium 52*. Amsterdam Elsevier, p. 3.
30. POLGE, C., SMITH, A.U., PARKES, A.S. (1949): *Nature*. 164, 666.
31. POLGE, C., WILLADSEN, S.M. (1978): *Cryobiology*. 15, 370.

32. RAPATZ, G., LUYET, B. (1965): *Biodynamica* 9, 333.
33. RAPATZ, G., LUYET, B., MACKENZIE, A. (1975): *Cryobiology*, 12, 293.
34. SCHILLING, E., DÖPKE, H.H. (1978): *Naturwissenschaften* 65, s. 658.
35. SCHILLING, E., NIEMANN, H., CHENG, S.P., DÖPKE, H.H. (1979): *Zuchthyg.* 14, 170 -172.
36. SCHILLING, E., SMITDT, D., SACHER, B., PETAC, D., EL KASCHAB, S. (1979): *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 5, 1625 -1629.
37. SHERMAN, J.K. (1962): *Anatomical Record.* 144, 171.
38. SMITH, A.U. (1953): *Mammalian Germ Cells. Ciba Foundation Symposium.* London, Churchill. p. 217.
39. THORPE, P.E., KNIGHT, S. C., FARRANT, J. (1976): *Cryobiology*, 13, 126.
40. WHITTINGHAM, D.G. (1973): *Bibliography of Reproduction.* 21, 273.
41. WHITTINGHAM, D.G. (1974): *Genetics (Supplement)* 78, 395.
42. WHITTINGHAM, D.G. (1974): *Journal of Reproduction and Fertility.* 37, 159.
43. WHITTINGHAM, D.G. (1975): *Journal of Reproduction and Fertility.* 43, 575.
44. WHITTINGHAM, D.G. (1977): *The Freezing of Mammalian Embryos. Ciba Foundation Symposium 52. Amsterdam Elsevier.* p 97.
45. WHITTINGHAM, D.G. (1978): *Cryobiology.* 15, 245.
46. WHITTINGHAM, D.G., LEIBO, S.P., MAZUR, P. (1972): *Science*, 178, 411.
47. WHITTINGHAM, D.G., LYON, M.F., GLENISTER, P.H. (1977): *Genetical Research.* 30, 287.
48. WHITTINGHAM, D.G., LYON, M.F., GLENISTER, P.H. (1977): *Genetical Research.* 29, 171.
49. WHITTINGHAM, D.G., WOOD, M., FARRANT, J., LEE, H., HALSEY, J.A. (1979): *Journal of Reproduction and Fertility.* 56, 11.
50. WILLADSENS, S.M. (1977): *The Freezing of Mammalian Embryos. Ciba Foundation Symposium 52. Amsterdam, Elsevier,* p. 175.
51. WILLADSENS, S.M. (1980): *9 th Int. Cong. Anim. Reprod. Madrid. Vol II.* 255, 261.

52. WILLADSEN, S.M., POLGE, C., ROWSON, L.E.A. (1978): Current Topics in Veterinary Medicine. The Hague. Martinus Nijhoff. p. 427.
53. WILMUT, I. (1972): Life Sciences. 11, 1071.
54. WILMUT, I., ROWSON, L.E.A. (1973): Veterinary Record. 92, 686.
55. WOOLGAR, A.E., MORRIS, G.J. (1973): Cryobiology. 10, 82.