

SIĞIR EMBRİOSUNUN DONDURULMASI **(Freezing of Bovine Embrvo)**

Hüseyin SUNGUR (*)

Nafiz YURDAYDIN ()**

SUMMARY

For last ten years, The developments recorded on the biotechnology have facilitated the control of reproduction processes in the animal husbandry and the obtained results have drawn attention at all times.

Embryo transferring means the transferring of embryo to uterus of another female by using surgical and non-surgical methods and the completing of all the gestation period in this uterus, after the taking out of this embryo which is at earlier phase from donor female. Putting of embryo transferring process on the practice with a 50 % of gestation success have focused all the interests on female brooders. As while 50 % of genetic can be controlled with a bull having a good performance, 100 % of genetic is possible to control with embryo. The above-mentioned developments on the biotechnology have obliged the animal breeders to take both female and male brooders in to the consideration.

Embryo transferring makes possible to obtain a lot of calves from superior quality female animals which not oblige to carry their own fetus during all the period of gestation. Suckling mother has not any influence on calve which she carries. But, receipts transfers the immunities against to some diseases to calve.

(*) Vet. Hek., PUGEM Arařtırma Dairesi, Hayvan Yetiřtirme ve Islah řb. Md.

(**) Yrd. Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, ANKARA.

As known, embryo transferring is applied together with superovulation process. The purpose of superovulation process is to provide to be produced ovum more than one during one cyclus. It is problem that superovulation exhibits a large variation. There fore, it is impossible to estimate amount of ovum or embryo to be obtained. Superovulation may not form in some cows, however superovulation more than 15 -20 % may form in some cows. Reaction of same cow to superovulation may be different in varioos times.

These factors make harder estimation of mother amount to be synchronized and caused to loss of embryo in sometimes.

Embryo transferring provided advantadges such as a considerable low transport cost and lower disease risks for costumers.

In this respect, since 1970's, embryo transferring has being considered as part of programmes relating to genetical improvements and research on the methods of embryo freezing have being intensed.

ÖZET

Son 10 yıldır, biyoteknolojide sağlanan gelişmeler hayvan yetiştiriciliğinde, üreme süreçlerinin denetimini kolaylaştırmakta ve elde edilen neticeler her defasında büyük yankılar uyandırmaktadır.

Çok erken safhadaki embryonun verici hayvanın (DONOR) uterusundan alınarak, aynı türden başka hayvanların uterusuna cerrahi veya cerrahi olmayan yöntemlerle nakli ve gelişecek yavrunun gebelik süresini burada tamamlaması demek olan embryo transferinin % 50 civarında gebelik başarısı ile uygulama alanına sokulması, dikkatleri dişi damızlıklar üstünde toplamıştır. Çünkü, iyi bir boğa ile genetiğin yarısı kontrol edilebilirken embryo ile % 10'unu kontrol etmek mümkündür. İşte biyoteknolojideki bu gelişmeler hayvan ıslahı ile uğraşanları dişi ve erkek damızlıkları beraber düşünmeye zorlamıştır.

Embryo transferi, artık tüm gebelik süresi boyunca kendi buzağılarını taşımak zorunda olmayan üstün nitelikli dişi hayvanlardan, daha fazla yavru elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Süt annelik yapan bir ineğin, taşıdığı buzağı üzerinde hiç bir etkisi yoktur. Ancak, taşıyıcı anne bazı hastalıklara karşı sahip olduğu muhafiyeti yavruya intikal ettirir. Bu nedenle embryo nakli, hayvan ıslahında avantajlı bulunmaktadır.

Bilindiği gibi embryo transferi, superovulasyon tekniği ile birlikte kullanılır. Süperovulasyonun amacı, bir siklus döneminde birden fazla ovumun üretilmesini sağlamaktır. Ancak süperovulasyonun geniş bir varyasyon göstermesi önemli bir sorundur. Elde edilecek ovum veya embryo sayısını önceden kestirmek mümkün değildir. Bazı sığırlarda süperovulasyon meydana gelmeyeceği gibi, bazılarında 15 -20 den fazla yumurta üretebilir. Aynı ineğin farklı zamanlarda süperovulasyona vereceği cevapta farklı olabilir.

Bütün bunlar bir verici için, kaç alıcı annenin sinkronize edilmesi gerektiğini zorlaştırmakta, zaman zamanda embryo kayıplarına neden olmaktadır.

Embryo ihracaatının, alıcıya sağlayacağı önemli ölçüde düşük nakliye bedeli ve daha az hastalık riski gibi avantajlarda vardır.

Bu yüzden 1970'li yıllardan beri embryo transferi genetik ıslah programlarının bir parçası olarak düşünülmüş ve embryonun dondurulma yöntemleri üzerindeki araştırmalar yoğunlaştırılmıştır.

GİRİŞ

1928 yılında Rus botanikçi VAVİLOV tarafından Leningrad'da bitki gen bankasının kurulmasından sonra, hayvan gen bankalarında kurulmasının bir ihtiyaç olduğu hissedilmeye başlanmıştır. 1952 yılında Audrey Smith'in bu konudaki öncü gayretlerinden sonraki gelişmeler Tablo 1' de gösterilmiştir. (4, 16, 19, 21).

Gen kaynaklarının muhafazasında 3 nokta büyük önem taşımaktadır.

1- Spermanın Dondurulması; Hemen hemen tüm çiftlik hayvanlarında uygulanmaktadır. (İnek, At, Koyun, Keçi ve Domuz). Canlı dişilerinde saklanması ile bu metot desteklenebilir.

2- Ovumun Kryoprezervasyonu; Spermanın dondurulması ve In-Vitro fertilizasyon ile gelecek vadetmektedir. Henüz tüm çiftlik hayvanlarında pratik olarak uygulanamamaktadır.

3- Embryonun Derin Dondurulması; Bugün için At, İnek, Koyun, Keçi' de en iyi gen muhafaza metodudur (4, 16).

Tablo 1- Memelilerde ilk Embryo Dondurma çalışmaları.

TÜRÜ	ARAŞTIRICI
Fare	Whittingham ve Ark. 1972 -1979 Kassai ve Ark, 1980 Wood ve Farrant 1980
Rat	Whittingham 1975.
Tavşan	Bank ve Maurer, 1975.
İnek	Wilmunt ve Rowson. 1973 Willaden ve Ark. 1978.
Koyun	Willaden ve Ark. 1976. Willaden. 1977.
Keçi	Bilton ve Moore 1976 -1979.
İnsan	Trounson ve Ark.1982.

Embryonun Saklanması; Genomun tamamını taşıması bakımından spermanın yada ovumun dondurulmasına göre avantajlıdır ve genetik özgeçmiş bilinen veya bilinmeyen bir süt anneye genotip değişikliği riski olmadan transfer edilebilir. Yangın, sel ve hastalık riski olmadan gen materyali uzun yıllar saklanabilir (4, 11, 15).

1- Sığır Embryosunun Kryoprezervasyonu

1973 yılında Wilmunt ve Dowson sığırlarda, 1977' de Willadsen koyunlarda embrioyu başarılı biçimde dondurduktan sonra bu embrioların dünyanın herhangi bir yerinden, başka bir yerine kolayca ve ucuz olarak taşınması genetik ilerleme için çok büyük kolaylıklar sağlamıştır (11, 14).

Embrioların kryoprezervasyonu laboratuvar hayvanlarında (Fare, Rat, Tavşan, Hamster) Çiftlik hayvanlarında (Sığır, Koyun, Keçi, At) ve Yabani hayvanlarda (Antilop, Maymun) ve insanda başarılı bir şekilde yapılabilmektedir. Farklı türlerde, farklı prosedürlerin uygulanmasına rağmen embriyonun derin dondurulmasında 5 genel prensip vardır.

- 1- Embryonun kryoprotektona maruz kalması,
- 2- Sıfırın çok altındaki derecelerde embryonun soğutulması,
- 3- $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de likit nitrojen içinde saklanması,
- 4- Dondurulmuş embryonun $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' den $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ye veya daha yüksek derecelere yükseltilmesi (Çözme),
- 5- Fizyolojik solusyona, embryonun dönmesi için kryoprotektanın dilusyonu (Rehidrasyon) (1, 8, 10).

2- Kryobiolojinin Prensipleri

Canlı bir hücrenin dondurulması hücre ile onu çevreleyen ortam arasındaki ısı ve su transportunu içine alan fiziko -kimyasal olaylar kompleksinden ibarettir (6, 8, 17, 18). Embryo ancak kryoprotektanın 1-2 M konsantrasyonlarında canlılığını koruyabilir. Hücre zarını geçebilen bir kryoprotektanın solusyona ilavesi esnasında hücrede osmotik değişiklikler başlar (2, 4, 8, 16). Dilusyon işlemi uygun olmayan oranlarda yapılırsa hücrenin canlılığı etkilenebilir.

Embryo kryoprezervasyonu üzerindeki çalışmalar iki gerekçe ile sürdürülmektedir.

- 1- Bütün embryoların yaşayabileceği basit ve çok etkili bir muhafaza metodunun bulunması,
- 2- Embryoya zarar veren mekanizmaların ve embryo kryobiolojisinin anlaşılması (8, 16, 17).

Embryo kryoprotektana maruz kaldığı zaman öncelikle ekstra -sellüler solusyonun hiperosmotik basıncıyla su kaybederek hacimce küçülür. Çünkü suyun permeabilitesi, kryoprotektanlardan daha fazladır (6, 17). Hacimce küçülme; suyun çıkışını, kryoprotektanın girişi dengeleyinceye kadar devam eder.

Kryoprotektan, permeabilite katsayısına ve ısıya bağlı olarak embryo içine girmeye devam eder (Dehidration). Daha sonra su tekrar hücre içine yeniden girerek tedricen büyümesine sebep olur.

Memeli embryo ve ovumlarının permeabilitesi hakkında çok az kantitatif bilgi mevcuttur. Değişik ısılarda fare embriosunun geçirgenliği üzerine bazı çalışmalar vardır. Bu çalışmalara göre;

1- Fertil ovum, in-fertil ovumdan çok daha geçirgendir.

2- İn - Fertil ovumun "sıcaklık geçirgenlik katsayısı" fertil ovumdan daha geniştir.

Bir tip hücrenin permeabilite karakterine bakarak diğer hücreler hakkında tahminde bulunulamaz. Bu çok önemlidir. Aynı şekilde bir hücrenin geçirgenlik katsayısına bakarak farklı türden aynı hücre içinde tahminde bulunulamaz.

Embryolar "Cryopreservation" yada çözme esnasında;

-Büyük buz kristallerinin oluşması,

-Çözünen kimyasal maddelerin intra-sellüler konsantrasyonun artışı,

-Ve dondurma sırasında dehidrasyondan dolayı hasara uğrar (Solution Effect).

Hızlı dondurma "Solution Effect" neticesi oluşan hasarı minimuma indirir. Ancak buz kristallerinin oluşumuna yol açar. Yavaş dondurma buz kristallerinin oluşumunu önler. Solusyon etkilerinden oluşan hasarı artırır. Bu sebeple optimal dondurma oranı, embryonun buz kristallerinden oluşan hasara ve solusyon etkilerinden kaynaklanan toksiteye, nispi toleransına bağlıdır. Bir hücre süspansiyonu 0 °C' nin altında soğutulduğunda, kalan likit sıvıda eriyen kimyasal maddelerin konsantrasyonundan dolayı buz kristalleri oluşur. (4, 6, 17).

Hücre membranı bir bariyer gibi etkileyerek intra-sellüler kompartmanlar içinde buz kristallerinin yayılmasını önler. Plazma membranından suyun geçişi için farklı bir basınç vardır. Su hücre dışına çıkma eğilimindedir. (Watson 1979). Su transportunun kolaylığı;

-Herhangi bir sıcaklıkta membran permeabilitesine,

-Yüzey/Volum oranına,

-Donma noktasına bağlıdır.

Eğer hücre su için yeteri kadar permeabil ise yada donma noktası yeteri kadar düşükse basınç küçük kalır ve Suyun ekstra-sellüler boşluğa hareketi ile dehidrasyon oluşur. Ekstra -Sellüler buz kristalleri hücreyi deforme etmesine rağmen, plazma membranını ruptüre etmez ancak kalıcı hasar oluşturur.

Dondurma mediumuna (FM) glycerol veya DMSO gibi kryoprotektanların ilavesi düşük ısıda donmayı sağlar. Bu muhtemelen hücrelerin dehidrasyonu ve solusyonların toksik etkilerinin geciktirilmesiyle oluşur. Böylece embriolar büyük buz kristallerinin oluşumunu önleyecek kadar yavaş şekilde soğutulabilir.

Kryoprotektanlar aşırı derecede mediumun osmolitesini artırdıkları ve toksik olabildikleri için belli aralıklarla ilave edilir ve adım adım uzaklaştırılır.

Optimal yaşama için düşük ısının kritik noktası soğutmada $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ile $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, çözmede ise $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ile $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' dir (4, 11, 14).

Yukarıda embryoların permeabilite katsayısının farklı olduğu belirtilmiştir. Bu farklılıklar aşağıdaki Tablo ile örneklenmiştir.

Tablo 2- $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de ve 1 ,5 M Glycerol sulasyonunda embryonun izotonik volümü için ihtiyaç duyduğu zaman (dk).

TÜR	SAFHA	EG	PG	DMSO	GLY
	UFO	4.5	2.9	5.1	200
FARE	Ovum	4.0	3.1	3.8	130
	UFO	2.4	1.7	2.3	85
HAMSTER	Ovum	2.7	1.5	3.8	25
	UFO	-	-	-	42
İNEK	Ovum	-	-	-	4.2

EG : 1,2 -Ethenediol

PG : 1,2 -Propanedol

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

GLY : Glycerol

Bu tabloda görüldüğü gibi türlerin ovum ve Embryolarının permeabilite karakteristiği çeşitli kryoprotektan solusyonlarda farklıdır.

3- Kryoprotektanlar

Bu terim suda çözünen, düşük moleküler ağırlıklı organik terkipleri işaret etmek için kullanılır. Kryoprotektanlar yüksek konsantrasyonlarda bile ovum veya embryo için toksik olmamalıdır. Düşük moleküler ağırlıklı kryoprotektanların nispi etkisi, bazı durumlarda yüksek moleküler ağırlıklı terkipler ile düzeltiler.

Kryoprotektanlarla ilgili diğer bir genel yorumda embryo veya ovumun içine nüfuz ederek soğuk şokundan koruma olgusudur (18). Çok çeşitli solusyonların yalnız veya kombine olarak embrioyu soğuğa karşı koruduğu demostre edilmiştir.

İlk çalışmalarda DMSO (1,5 M) kryoprotektan olarak sığır ve koyunlarda kullanılmıştır (Willadsen, Rowson). 1970'li yılların sonlarına doğru gliserol ineklerde morula ve Blastosist safhaları için iyi bir protektan olmuştur. Bugünde gliserol 1-1,5 M konsantrasyonlarda iyi bir kryoprotektan olarak kullanılmaktadır.

Ticari ET merkezlerinde ve araştırmalarda ilk zamanlarda, DMSO veya gliserolün ortamdaki uzaklaştırılması veya ilavesi konservatif metodlar ile yapılmakta idi. Konsantrasyon genellikle 2-6. safhada 20-30 dk. içinde artırılmakta ve 4-6. safhada 40-60 dk. içinde dilue edilmektedir (6, 8, 11).

7 günlük sığır embriosunun oda sıcaklığında 1,5 M gliserol/PBS solusyonu içinde 10-15 dk. bırakılması ekiblarasyon sağlamakta, osmotik basınç stresinden dolayı hiçbir hasar oluşmamaktadır (6).

Çözmeden sonra kryoprotektanların embriyodan yavaş uzaklaştırılması, hücrelerin osmotik erimesinden sakınmak için önemlidir.

Sukroz, kryoprotektanın embriyodan uzaklaştırılması esnasında ekstrasellüler ortamda yüksek basınç sağlayan iri moleküllü, nonpermeable bir ajandır (10).

Leibo ve Mazur dondurma mediumuna sukroz gibi non-permeable solütlerin ilave edilmesinin osmotik şoku önlediğini bildirmektedirler. Sukroz kullanılması halinde ise, gliserol embrioyu girişinden çok daha hızlı bir şekilde terk eder. Sukroz diğer bir kryoprotektanla birlikte bulunması halinde de embriyonun yaşamasını büyük ölçüde artırmaktadır (7).

Sukroz ilk defa 1963 yılında Row ve Arkadaşları tarafından alyuvarların dondurulması ve çözülmesi esnasında glycerolün intra-cellüler sıvıdan uzaklaştırılması için başarılı bir biçimde kullanılmıştır.

4- Derin Dondurmanın Gelişimi

Biolojik aktivitenin olmadığı değişik ısı derecelerinde memeli hayvanların embriyoları dondurularak, uzun süre saklanabilmektedir. Koyun, Keçi, Sığır ve fare embriyoları, - 30 °C ila - 50 °C' de dondurulmakta ve hızlı çözmeye dayanabilmektedir (37 °C).

Bir hücre safhasından, blastosist sathasına kadar fare embryosunun derin dondurulmasının Whittingham ve Wilmut tarafından 1972 yılında demostre edilmesinden sonra, diğer türlerde de benzer çalışmalar bir çok araştırmacı tarafından yapılmıştır. Fare embryolarının başarılı dondurulmasından hemen sonra 10-12 günlük sığır embryoları – 60 °C' de DMSO/PBS içinde 0.2 °C/dk. Oranında soğutulup, hızlı çözünme sonu (360 °C/dk.) normal gebelik elde edildiği Wilmunt ve Rowson tarafından ortaya konmuştur.

Koyun embryoları 0 °C' de bir hücreden, blastosist sathasına kadar soğutmaya toleranslıdır. Koyun ve Keçide derin dondurma çalışmaları morula ve blastosist safhasında yoğunlaşmıştır. İlk gözlemlere göre atlarda 6 günlük blastositlerin soğutulmasında, hücrelerde değişiklik oluşmadığı görülmüştür (6).

Embriolar dakikada 1 °C' den daha az soğutulduğundan ısı –135 °C kadar bile düşürülse intro-sellüler buz oluşumu yoktur. Fakat soğutma oranı dk/5°C intro - sellüler donma – 40 °C ila – 50 °C' de ortaya çıkar. İntra sellüler buzun generasyon etkileri çözme sırasında büyümesi ve kristalizasyonu ile oluşur. Yada intra-sellüler buz eriyiğinin hücre yüzeyine osmotik stresinden dolayı degenerasyon oluşur.

Cerrahi olmayan metodla vericilerden embryo elde edilmesinin gelişmesi ile birlikte 7. günde kompakt morula ve blastosist sathasındaki embryolar saha şartlarındaki çalışmaları için uygun bulunmuştur. Çünkü;

- 1- Henüz zona pellucida içindeki embryonun izalasyonu ve identifikasyonu kolaydır.
- 2- Non-Surgical metodla direkt transfer mümkündür.
- 3- İn-Vitro olarak kültüre edilmesi mümkündür (6).

Morula ve blastosist safhasında embryoların düşük ısılara toleransı vardır. Bir çok örnekte 15 °C' nin altındaki ısılarda hasarlar oluşur, 15 °C' nin altında domuz embryosu soğutmaya aşırı hassastır.

5- Soğutma Oranı

Uzun yıllar embryonun yavaş soğutulmasının canlılık için mutlaka gerekli olduğuna inanılmıştır. Embryoların dondurulmasına ilişkin ilk yayınlar, – 80 °C' ye kadar 0.3 –2 °C/dk. oranının zorunlu olduğu ve 1,5 M glycerol içinde embryonun yaşamasının soğutma oranına bağlı (0.25 –0.8 °C/dk.) olduğunu göstermektedir. Türler arasındaki farklılıklar olmasına rağmen ortalama soğutma sistemi 0.5 °C/dk. olmalıdır. Embryonun yaşaması soğutma oranına zıt orantı gösterir.

Düşük oranlarda soğutmada yüksek yaşama şansı, yüksek oranlarda soğutmada embryonun hiç yaşama şansının olmadığı Mazur tarafından ortaya konmuştur. Yeterli miktar düşük soğutma embrioya osmotik respons zamanı tanıyarak intracellüler donmayı önler ve yaşama şansını artırır.

Yapılan çalışmalar göre büyük baş hayvanlarda embryonun $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ye konmadan önce $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar tedricen soğutulması yaşama şansını artırmaktadır (2, 19). Tedrici soğutmaya karşın embryonun yaşaması hızlı bir çözmeye ihtiyaç göstermektedir. Süper soğutmanın kolay oluşması için solusyonda kristalizasyonun (Seeding) indüklenmesi gerekmektedir. Doğru dondurma noktası (1.4 M glycerol/PBS) için $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' dir. Kristalizasyon oluştuğu zaman ısı $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ veya daha aşağı ise, embrio ölmektedir (1, 13, 14, 15, 17, 18).

6- Çözme (Warming-Rate)

Çözme embryonun rehidrasyon derecesine bağlı olarak yavaş veya hızlı olabilir. Embryonun yaşaması yavaş çözme gerektirmektedir, $25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{dk.}$ veya daha az (21). Sonraki çalışmalar ise, çok hızlı çözmenin yaşamayı artırdığını göstermektedir (4 sn.) (3, 12, 13).

Çözme Solusyonları Hazırlanışı

Embryonun çözünebilmesi için 4 stok solusyona gereksinim vardır.

- 1- Glycerol Solusyonu: 12.60 gr (10 ml) gliserol +100 ml MPBS +- BSA (Modifiye Fosfat buffer saline + Bovine serum albümine).
- 2- Sucrose Solusyonu: 46.90 gr sucrose + 100 ml. MPBS + BSA
- 3- Rehidrasyon Solusyonu A: 50 ml gliserol sol. + 50 ml sucrose. sol.
- 4- Rehidrasyon Solusyonu B: 50 ml sucrose + 50 ml MPBS + BSA

Stok solusyonlarının hazırlanmasından sonra 4 ayrı petri kutusuna aşağıdaki solusyonlar konur.:

1. Petri kutusuna 1 ml glicerol sol.
2. Petri kutusuna 1 ml Rehidrasyon sol. A.
3. Petri kutusuna 1 ml. Rehidrasyon sol. B.
4. Petri kutusunda 1 ml. MPBS -BSA konarak hazırlanır.

Embryolar 1. kutudan 4.' ye doğru sırasıyla 5 - 7 dk. oda sıcaklığında bekletilerek çözme işlemi tamamlanır.

7- Embryonun Tanımlanması ve Sınıflandırılması (Klasifikasyon)

Başarılı bir dondurma prosedürü için öncelikle yapılması gereken embriyonun dehidrasyonundan sonra stero-mikroskop altında gelişim safhalarının ve derecesinin tayin edilmesidir.

Tanımlanması (İdentification):

Erken Morula : Hücreler arası artmış ve hücre kitlesi yoğunlaşmaya başlamıştır. Hücre kitlesi düzensiz bir şekildedir. Perivitelline alan geniş, bir kaç tane hücre, kitleden ihraç edilmiş durumdadır.

Geç Kompakt Morula: Hücre kitlesi düzenli bir haldedir ve zona pellucida içindeki alanı doldurmaya başlamıştır. Blastomerleri ayırt etmek güçleşmiştir. UFO ile karıştırılabilir.

Erken Blastocyst : Yakın bir şekilde bir araya toplanmış, hücreler arasında oluşmuş blastomer denilen boşluğa bir sıvı doldurmuştur. Blastoselin etrafında trofoblastik hücreler ayırt edilir. Belirgin bir ferivitelline boşluk oluşur.

Blastocyst : Blastosel tamamen oluşmuştur. Trafoblastik hücrelerde bir tabaka halindedir. Embrio perivitelline boşluğun çoğunu veya tamamını işgal etmiştir.

Exponded Blastosist : Zona pellucida gözle görülür ölçüde incelenmiş, çok ince tabaka halinde trofoblastik hücreler zona pellicida'ya basınç yapmaktadır. İç hücre kitlesi ancak çok dikkatli bakmakla görülebilir.

Hatched Blastocyst : Zona pellicida yırtılmış ve trofoblastik hücreler kurtulmuştur.

Sınıflandırma (Clasification):

- 1- Mükemmel : Gözle görülür hiç bir kusuru yoktur.
- 2- İyi : Çok az kusuru olup, asimetriktir. Diğer embryolara göre gelişmesinde çok az bir gecikme vardır. Bir veya iki blastomer hücre kitlesinden ihraç olmuş vaziyettedir.

- 3- Orta : Bir veya daha fazla gözle görülür kusuru vardır. Gelişmesi 1-2 gün gecikmelidir.
- 4- Zayıf : Hücreler çok az organize olmuştur. Dejenerasyon belirtileri vardır. Gelişmesinde 2-3 günlük gecikme vardır.
- 5- Degenere Embrio: Gelişmesi en az 3 gün gecikmiştir.
- 6- UFO : Fertilize olmamıştır. Hiç bir hücre gelişmesi görülmez (9).

8- Rutin Dondurma ve Çözme yöntemi

7 günlük siğir embryosu için aşağıdaki işlemler uygulanır.

1- Morfolojik olarak normal bulunan embryolar pipete alınarak direkt olarak 1.0 -1.5 M glycerol/PBS solusyonuna transfer edilir (One-Step) yada glycerol konsantrasyonları tedricen artan PBS içinde belli sürelerde tutulur.

-0.3 M glycerol/PBS : 2-3 dk.

-0.75 M glycerol/PBS : 4-10 dk.

-1.5 M glycerol/PBS : 6-10 dk.

2- Embryolar etiketlenmiş payetlere alınır.

3- Kristalizasyon (Seeding) için -5 ila -7 °C' de 1.5 M glycerol/PBS içinde 10 dk. bekletilir. Ekstra-Sellüler solusyonun kristalizasyonunu payetin dış kısmından soğutulmuş Forceps ile tutularak başlatılır.

4- -35 °C' ye kadar soğutma oranı $0.3-0.8$ °C/dk. olacak şekilde soğutma cihazı ayarlanır. -35 °C' de embryonun 10-15 dk. bekletilmesi tavsiye edilir.

5- -196 °C'deki likit nitrojene konur.

6- Çözme $20-37$ °C' deki su banyosunda yaklaşık 4 sn'de yapılır.

7- Payet bir ucundan kesilerek embryo bir petri kutusuna alınır ve kryoprotektanın embryodan uzaklaştırılması işlemine başlanır (Rehidration).

- 0.6 M glycerol/PBS : 5- 7 dk.
- 0.3 M glycerol/PBS : 5-7 dk.
- PBS+BSA % 04 :10dk.
- Yada 0.5 M Sukroz/PBS : 5-10 dk.

8- Son olarakta embryo PBS + % 04 BSA solusyonunda kültüre edilerek, Morfolojik olarak yeniden değerlendirilerek transfer edilir (1, 2, 4, 12, 13, 14, 19).

9- Sonuç

Bugün, embryo transfer yöntemleri gelişmiş olmasına karşın hayvan yetiştiriciliğinde çok yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bunun en büyük sebeplerinden biri tekniğin pahalı oluşudur. Genetik materyalin bir ülkeden, bir başka ülkeye transportunda donmuş embryo ile büyük kolaylıklar sağlanmıştır. Ancak donmuş embryo transferindeki gebelik oranının henüz istenilen seviyede olmaması kullanılmasında kimi güçlükler göstermektedir.

Tablo 4- Donmuş Embryo ile Yapılan Transfer Çalışmaları (Leibo 1986).

Yıl	Gebe İnek Sayısı	Transfer Edilen Donmuş-Çözül. Embryo	Elde Edilen Gebelik Oranı (%)
1981	76	305	24.9
1982	137	461	29.7
1983	114	493	23.1
TOPLAM	327	1259	26.1

Ancak, gerek taze, gerekse dondurulmuş embryoların dölverimine etki yapan faktörlerin kontrol altına alınmasıyla, hayvan varlığını ıslah etmek durumundaki ülkelerde kullanılması kaçınılmaz bir biyoteknoloji olacaktır.

Dölverimine etki eden faktörler;

- 1- Dondurmadan önce ve çözmeden sonra embryonun kalitesi ve safhası,
- 2- Alıcı ve vericilerin sinkronize derecesi,
- 3- Alıcıların fertilitite dereceleri,
- 4- Teknisyenin hüneri,
- 5- Transferin kolaylık derecesi,
- 6- Embryo kültür media,
- 7- Embryoların uterusdan alınmasından transfere kadar geçen süre,
- 8- Çevresel faktörler.

LİTERATÜR

1. BIELANSKI, A., SCHNEIDER, U., PAWLYSHYN, Vv.P. and MAPLE-TOFT, R.J. (1986): Faktors affecting survival of deep frozen bovine embryos in vitro. The effect of freezing container and method of removing cryoprotectand. *Theriogenology* 25: 429 -437.
2. COCERO, M.J., PROCUREUR, R., DE LA FUENTE, J., CHUPIN, D. (1988): Glycerol or ethylene glycol for cryoprotectantion of deep frozen ewe embryos. *Theriogenology* 29: 238.
3. FRANKS, G.C., COLEY, S.L., BETTERBED, B. and PAGE, R.D. (1986): The effect of freezer type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology* 26: 135.
4. HAFIZ, E.S.E. (1987): Reproduction in farm animals in. *Prezervation and cryopreservation of gametes and embryo* page: 571 -601.
5. KILIÇOĞLU, Ş.Ç. (1986): Sekiz Hücreli fare embryolarının dondurulma ve çözdürülmeleri. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* 33: 394.
6. LINDER, G.M., RAYMOND, W., WRIGHT, J.R. (1983): Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407 -415.
7. LEIBO, S.P. (1984) : A One-step method for direct nonsurgical transfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21: 767 -785.
8. LEIBO, S.P. (1988): Cryopreservation of embryos 11 th internat. Congress Anim. Reprod and A.I. Vol:5 PP: 370.

9. LEHN -JENSEN, H. (1984): Deep freezing of cattle embryos. Xth internat. Congress Anim. Reprod and A.I.
10. LINDER, G.M., ELLIS, D.E (1985): Re(rigenition of bovine embryos. *Theriogenology* 23: 203 -215.
11. MAHON, G.D., RAWLE, J.E. (1987): The export of Deef-Frozen bovine embryos. *Theriogenology* 27: 21 -35.
12. MASSIF, A., VANDER ZWALMAN, P., ECTORS, F. (1987): Recent progress in cryopreservation on cattle embryos. *Theriogenology* 27: 69 -79.
13. NIEMANN, H. (1985): Freezing on Bovine embryos. Effect of A one - stop addition of 1.4 M glycerol. *Theriogenology* 23: 369 -379.
14. PRATHER, R.S., SPIRE, M.F., SCHALLER, R.R. (1987): Eoolution of cryopreservation techiques for bovine embryos. *Theriogenology* 28: 195 -205.
15. STAPLES, T.R., PAGE, R.D. (1987): Freezing bovine embryos with a portable liquid nitrogen. Freezer Requiring no external seeding. *Theriogenology* 28: 648 -657.
16. SABHER, B. (1987): Biotechnology as a tool for gene prezerootion. Sypodium on biotechnology in Animal Breeding. BERLIN.
17. SCHNEIDER, U., MAZUR, P. (1984): Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and it's relation to the survival of frozen -thawed embryos. *Theriogenology* 21: 68 -79.
18. TROUNSON, A.O., SHEA, B.F., OLLIS, G.W, JACOPSON, M.E. (1978): Frozen storage and transfer of Bovine embryos *journal of Animal, Sicience* 47: 677-681.
19. WILLADSEN, S., POLGE, C., ROWSON, E.A. (1978): The viability of deep-frozen cow embryos *J. reprod. Fert.* 52: 391 -393.
20. WILLIAM, H., DETTIT, J.R. (1985): Commercial freezing of bovine embryos in glase ampules. *Theriogenology* 23: 13 -29.
21. WILMUT, I., ROWSON, E.A (1973): The successful cow-temperature preservation of mouse and cow embryos. *J. Reprod. Fert.* 33: 352.