



T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR EMBRİYOLARININ OPS VE MODİFİYE PAYET  
YÖNTEMİYLE VİTRİFİKASYONU**

**Öğr. Gör. Şöhret GÜLER**

**DOKTORA TEZİ**

VETERİNERLİK DOĞUM VE JİNEKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**Danışman**  
**Prof. Dr. Yunus ÇETİN**

**BURDUR-2025**



T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR EMBRİYOLARININ OPS VE MODİFİYE PAYET  
YÖNTEMİYLE VİTRİFİKASYONU**

**Öğr. Gör. Şöhret GÜLER**

**DOKTORA TEZİ**

VETERİNERLİK DOĞUM VE JİNEKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**Danışman**  
**Prof. Dr. Yunus ÇETİN**

Bu Araştırma, “*Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü*” tarafından “0805-DR-22” proje numarası ile desteklenmiştir.

**BURDUR-2025**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

### SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

*Şöhret GÜLER* tarafından *Prof. Dr. Yunus ÇETİN* yönetiminde hazırlanan “*Sığır Embriyolarının OPS ve Modifiye Payet Yöntemiyle Vitrifikasyonu*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi Anabilim Dalında *Doktora Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Sınavı Tarihi: 22/01/2025**

Prof. Dr. Erhan ÖZENÇ  
Afyon Kocatepe  
Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi  
**Başkan**

Prof. Dr. Yunus ÇETİN  
  
Burdur Mehmet Akif  
Ersoy Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
**Jüri**

Prof. Dr. Duygu BAKİ  
ACAR  
Afyon Kocatepe  
Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi  
**Jüri**

Prof. Dr. Ali Reha  
AĞAOĞLU  
Burdur Mehmet Akif  
Ersoy Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
**Jüri**

Doç. Dr. Şükrü  
GÜNGÖR  
Burdur Mehmet Akif  
Ersoy Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
**Jüri**

### ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 3/02/2025 Tarih ve 4 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Müdür  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
Prof. Dr. Ramazan ADANIR

## TEŞEKKÜR

“Sıgır Embriyolarının OPS ve Modifiye Payet Yöntemiyle Vitrifikasyonu” başlıklı tez çalışmamda bana ışık tutan, yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Yunus ÇETİN olmak üzere desteklerini esirgemeyen Doğum ve Jinekoloji Anabilim dalındaki tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. İstatistiksel analizlerde desteklerini esirgemeyen ve Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı olan kıymetli hocamız Dr. Öğr. Üyesi Bekir ÇETİNTAV’a teşekkür ederim. Tezime katkı sağlayan Selçuk Üniversitesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim dalındaki Doç. Dr. Hasan ALKAN’a, Doç. Dr. Kübra KARAKAŞ ALKAN’a ve Doç. Dr. Fatma SATILMIŞ’a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana ilham veren, maddi ve manevi destekleriyle bana güç veren annem Ümran GÜLER başta olmak üzere babam Süleyman GÜLER’e, ablam Sevdâ GÜLER’e ve erkek kardeşim Osman GÜLER’e teşekkürlerimi sunarım.



## ETİK BEYAN

***“Sığır Embriyolarının OPS ve Modifiye Payet Yöntemiyle Vitrifikasyonu”*** başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Yunus ÇETİN danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Şöhret GÜLER

22/01/2025

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
| İÇ KAPAK SAYFASI                                                                     | i    |
| KABUL ve ONAY SAYFASI                                                                | ii   |
| TEŞEKKÜR                                                                             | iii  |
| ETİK BEYAN                                                                           | iv   |
| İÇİNDEKİLER                                                                          | v    |
| ŞEKİLLER                                                                             | vii  |
| TABLolar                                                                             | x    |
| SİMGELER ve KISALTMALAR                                                              | xi   |
| ÖZET                                                                                 | xii  |
| ABSTRACT                                                                             | xiii |
| 1. GİRİŞ                                                                             | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER                                                                    | 6    |
| 2.1. Embriyoların Kriyoprezervasyonu                                                 | 6    |
| 2.1.1. Yavaş Dondurma Yöntemi                                                        | 7    |
| 2.1.2. Vitrifikasyon Yöntemi                                                         | 11   |
| 2.2. Ultra Hızlı Vitrifikasyonda Kullanılan Modifiye Gereçler                        | 18   |
| 2.2.1. OPS Vitrifikasyonu                                                            | 18   |
| 2.2.2. Katı Yüzey Vitrifikasyonu                                                     | 18   |
| 2.2.3. Cam Mikropipet                                                                | 19   |
| 2.2.4. Vitrifikasyon Spatulası                                                       | 19   |
| 2.2.5. Ticari Ultra Hızlı Vitrifikasyon Gereçleri                                    | 20   |
| 2.3. Farklı Vitrifikasyon Gereçleriyle Vitrifiye Edilen IVP Embriyolarının Canlılığı | 26   |
| 2.4. IVP ve IVD Embriyoların Kriyoprezervasyonunu Etkileyen Farklılıklar             | 28   |
| 2.5. Kriyoprezervasyon Aşamalarında Karşılaşılan Hücresel Hasarlar                   | 32   |
| 2.6. Vitrifikasyon Yönteminin Kullanımını Sınırlayan veya Engelleyen Faktörler       | 35   |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM                                                                   | 37   |
| 3.1. Ovaryumların Toplanması ve Laboratuvara Getirilmesi                             | 37   |
| 3.2. Oositlerin Folikül Aspirasyonu ile Elde Edilmesi ve Seçilmesi                   | 38   |
| 3.3. <i>İn Vitro</i> Maturasyon                                                      | 40   |
| 3.3.1. Maturasyon Değerlendirilmesi                                                  | 41   |
| 3.4. <i>İn Vitro</i> Fertilizasyon                                                   | 41   |
| 3.4.1. Spermanın Hazırlanması                                                        | 42   |
| 3.5. <i>İn Vitro</i> Kültür                                                          | 44   |
| 3.6. Deney Düzenegi                                                                  | 46   |
| 3.7. Vitrifikasyon Gereçlerinin Hazırlığı                                            | 48   |
| 3.8. Vitrifikasyon ve Çözdürme Solüsyonlarının Hazırlığı                             | 49   |
| 3.9. Embriyolarının Vitrifikasyonu                                                   | 50   |
| 3.9.1. OPS Vitrifikasyonu                                                            | 51   |
| 3.9.2. MP Vitrifikasyonu                                                             | 52   |
| 3.10. Vitrifiye Embriyoların Çözdürülmesi                                            | 54   |
| 3.11. Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi                                          | 56   |
| 3.12. İstatistiksel Analiz                                                           | 56   |

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. BULGULAR</b>                                            | <b>57</b> |
| <b>4.1. Maturasyon Sonrası Bulgular</b>                       | <b>57</b> |
| <b>4.2. Embriyoların Kùltür Sonrası Bulguları</b>             | <b>58</b> |
| <b>4.3. Vitrifiye Embriyoların Çözdürme Sonrası Bulguları</b> | <b>59</b> |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                            | <b>62</b> |
| <b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                                   | <b>71</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                              | <b>72</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                               | <b>87</b> |



## ŞEKİLLER

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                 |           |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Şekil 1.1.</b>  | Yıllara (2003-2022) göre kaydedilen sığır embriyo (IVD, IVP ve toplam) sayısı (Viana, 2023)                                                                                                                                                                     | <b>3</b>  |
| <b>Şekil 1.2.</b>  | Kullanılan tekniğe (IVD veya IVP) ve embriyo tipine (taze veya dondurulmuş) göre 2003-2022 yılları arasında sığırlarda embriyo transferleri. (A) Transfer edilen embriyo sayısı. (B) Yıllık toplam embriyo transferlerinin yüzde payı (Viana, 2023)             | <b>3</b>  |
| <b>Şekil 2.1.</b>  | Yavaş dondurma yönteminde soğutma hızının hücre kriyoprezervasyonundaki öneminin şematik gösterimi (Ribeiro ve ark., 2022)                                                                                                                                      | <b>8</b>  |
| <b>Şekil 2.2.</b>  | Payet içine embriyonun yüklenmesi (Hasler, 2002)                                                                                                                                                                                                                | <b>9</b>  |
| <b>Şekil 2.3.</b>  | Direkt transfere uygun yavaş dondurma yönteminin şematize hali (Gómez ve ark., 2020)                                                                                                                                                                            | <b>11</b> |
| <b>Şekil 2.4.</b>  | Vitrifikasyon sürecinin şematik gösterimi ve hücre kriyoprezervasyonunu sağlamak için kriyoprotektan ajanların (KP'lar) önemi (Ribeiro ve ark., 2022)                                                                                                           | <b>12</b> |
| <b>Şekil 2.5.</b>  | Direkt transfer prosedürüne uygun vitrifiye edilecek payet (Campos-Chillon ve ark., 2006)                                                                                                                                                                       | <b>13</b> |
| <b>Şekil 2.6.</b>  | Direkt transfer tekniğine uygun payette vitrifikasyonun şematize hali (Satılmış ve ark., 2014)                                                                                                                                                                  | <b>14</b> |
| <b>Şekil 2.7.</b>  | Vitrifikasyon başarı olasılığı formülü (Yavin ve Arav, 2007)                                                                                                                                                                                                    | <b>14</b> |
| <b>Şekil 2.8.</b>  | OPS. (a) Hücrelerin OPS payetine yüklenmesi. (b) OPS payetinin LN içine daldırılması. (c) OPS payetinin çözündürülmesi (Vajta ve ark., 1998a)                                                                                                                   | <b>18</b> |
| <b>Şekil 2.9.</b>  | Katı yüzey vitrifikasyonu (Dinnyés ve ark., 2000)                                                                                                                                                                                                               | <b>19</b> |
| <b>Şekil 2.10.</b> | Vitrifikasyon Spatulası. (A) İnce plaka sağ üstte ve takılı olduğu kriyo şişe kapağı sol altta. (B) Embriyoların vitrifikasyon spatulasına yüklenmesi (Tsang ve Chow, 2009)                                                                                     | <b>20</b> |
| <b>Şekil 2.11.</b> | Cryoloop (Saki ve Ghalambor Dezfuly, 2005)                                                                                                                                                                                                                      | <b>20</b> |
| <b>Şekil 2.12.</b> | Cryotop. (a) Polietilen laminat film ve payet kapağı, (b) payet kapağı ile kapanan Cryotop (Hiraoka ve ark., 2004)                                                                                                                                              | <b>21</b> |
| <b>Şekil 2.13.</b> | Cryotech. (a) Cryotech üzerine hücrenin yüklenmesi şematiği, (b) üzerine hücreler yüklenmiş cryotech görünümü (Anonim 2024a)                                                                                                                                    | <b>22</b> |
| <b>Şekil 2.14.</b> | Cryolock (Anonim 2024b)                                                                                                                                                                                                                                         | <b>23</b> |
| <b>Şekil 2.15.</b> | Cryoleaf. (a) Cryoleaf'ın ana kısmı ve ok, ince polietilen çubuktan yapılmış yükleme kısmını gösterir. Yeşil kısım yükleme çubuğunu korumak için aşağı kaydırılabilir. (b) Depolama için koruyucu kılıf. (a+b) Koruyucu kılıfı takılmış Cryoleaf (Anonim 2024c) | <b>23</b> |
| <b>Şekil 2.16.</b> | Cryotip (VerMilyea ve Brewer, 2017)                                                                                                                                                                                                                             | <b>24</b> |
| <b>Şekil 2.17.</b> | Kapatılmış ve etiketlenmiş Cryotip (VerMilyea ve Brewer, 2017)                                                                                                                                                                                                  | <b>24</b> |
| <b>Şekil 2.18.</b> | Kitasato vitrifikasyon sistemi. (a) Koruyucu payet kapağı. (b) Kitasato Vitrifikasyon Sistemi, akrilonitril bütadien stiren reçine tutucu ve bir destekten oluşur. Destek, bir polietilen                                                                       | <b>26</b> |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |           |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|                    | tereftalat (PET) film ve PET filmin üzerine yerleştirilen, vitrifikasyon solüsyonunu emen gözenekli bir membrandan oluşur (Momozawa ve ark., 2023)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |           |
| <b>Şekil 2.19.</b> | Polietilen tereftalat film üzerine yerleştirilen bir vitrifikasyon solüsyonu emicisi olan gözenekli bir membranın olduğu (a) ve olmadığı (b) Kitasato Vitrifikasyon Sistemi'nin vitrifikasyon solüsyonunun (yaklaşık 0,6 µl) yüklendiği kısmın görünümü (Momozawa ve ark., 2023)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>26</b> |
| <b>Şekil 2.20.</b> | Preimplantasyon embriyo gelişimi sırasında meydana gelen hassas genetik ve epigenetik olayların <i>in vitro</i> embriyo üzerinde etkili olan temel kimyasal (turuncu) ve fiziksel (mavi) stres faktörlerinin özeti (Ramos-Ibeas ve ark., 2019)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <b>29</b> |
| <b>Şekil 2.21.</b> | Embriyonik gelişimsel yeterlilik edinimi için gerekli hücrel ve moleküler olaylar ve bunun kriyo-hayatta kalma üzerindeki etkisi. <i>In vitro</i> embriyo üretimi için birbirine bağlı adımlar (soldan sağa mavi oklar) üstün kalitede bir embriyo üretilmesini ve embriyonun kriyo-hayatta kalma başarısını artırabilir. (a) Embriyo yeterliliğinin kazanılması üzerine genel olarak çevresel ve genetik etkiler. (b) Üstün embriyo kalitesinin <i>in vitro</i> embriyo üretimi ile ilişkili belirleyici değişkenler (mükemmel kalitede taze IVP blastosistler). (c) Kriyoprezervasyon ve kriyoprezervasyon tekniğinin etkileri sonrasında gelişimin başarılı bir şekilde yeniden başlatılması (çözdürme sonrası IVP blastosistlerinin re-ekspansiyonu). Tüm olaylar (a, b ve c) embriyonun dondurularak hayatta kalmasını etkiler (Marsico ve ark., 2019). | <b>32</b> |
| <b>Şekil 2.22.</b> | Kriyoprezervasyon işlemi sırasında oositlerin, zigotların ve blastomerlerin kriyoyaralanmasını gösteren şematik resim.↑: Arttı, ZP: Zona pellusida (Kumar ve ark., 2022)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>33</b> |
| <b>Şekil 3.1.</b>  | Ovaryumlar için kullanılan termos (a) ve serviyet üzerine yerleştirilen ovaryumlar (b)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>37</b> |
| <b>Şekil 3.2.</b>  | Aspirasyon işleminde iğne ucunun yukarıya bakması (a), foliküllerin aspirasyonu (b), üstte folikülleri bulunan altta folikülleri aspire edilen ovaryum görüntüsü (c)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>38</b> |
| <b>Şekil 3.3.</b>  | Oositlerin yıkanarak petriye aktarılması. Aspirasyon işlemi bittikten 5 dk sonra tüpteki folikül sıvısının uzaklaştırılması (a), 2. yıkamada 5 dk bekleme sonrası tüpün dipinde oluşan tortu (b), yıkama sonunda berrak aspirasyon medyumunu görünümü (c) ve tüpteki oositlerin petri kabına aktarılması (d)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>39</b> |
| <b>Şekil 3.4.</b>  | Tarama yönü (a), petrinin görüntüsü (b) ve oositler (c)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>39</b> |
| <b>Şekil 3.5.</b>  | Maturasyon medyumunun (500 µl) petrinin kuyucuklu kısmına yayılarak hazırlanması (a), maturasyon yıkama droplarının oluşturulması (b)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>40</b> |
| <b>Şekil 3.6.</b>  | Fertilizasyon petrisi (a), fertilizasyon medyumuna spermanın eklenmesi esnasında alınan görüntü (b)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>42</b> |
| <b>Şekil 3.7.</b>  | Spermanın hazırlanması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>43</b> |
| <b>Şekil 3.8.</b>  | Thoma lamının hazırlanması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>43</b> |
| <b>Şekil 3.9.</b>  | Thoma lamındaki spermatozoonların sayımı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>44</b> |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Şekil 3.10.</b> | Fertilizasyon medyumuna katılması gereken sperma hacminin hesaplanması formülü                                                                                                                                                                       | <b>44</b> |
| <b>Şekil 3.11.</b> | Dört bölmeli petrinin hazırlanması (a), olası zigotların vortekslenmesi için hazırlanan 1,5 ml'lik santrifüj tüpü (b), olası zigotların vortekslenmesi (c)                                                                                           | <b>45</b> |
| <b>Şekil 3.12.</b> | Soyulan edilen olası zigotların dört bölmeli petrinin 1. bölmesine bırakılması (a), 3. bölmede oluşturulan yıkama damlaları (b), mikroskopun kamerasına bağlı bilgisayarın ekranında olası zigotların damlalarda aktarılması görünümü (c)            | <b>46</b> |
| <b>Şekil 3.13.</b> | Fertilizasyon sonrasında kumulus hücreleri soyulan olası fertilize oositlerin (a), 1 PB'li oositin (b) ve 2 PB'li oositin (c) görüntüsü                                                                                                              | <b>46</b> |
| <b>Şekil 3.14.</b> | Deney dizaynının şematiği                                                                                                                                                                                                                            | <b>47</b> |
| <b>Şekil 3.15.</b> | Farklı OPS payetlerinin çap ve duvar kalınlığı ölçümleri                                                                                                                                                                                             | <b>48</b> |
| <b>Şekil 3.16.</b> | Farklı MP'lerin çapı ve duvar kalınlığı (a), embriyonun yüklendiği uç kısmın uzunluğu ve çapı (b)                                                                                                                                                    | <b>49</b> |
| <b>Şekil 3.17.</b> | Vitrifikasyon için hazırlık                                                                                                                                                                                                                          | <b>50</b> |
| <b>Şekil 3.18.</b> | OPS vitrifikasyon petrisinin şematiği                                                                                                                                                                                                                | <b>51</b> |
| <b>Şekil 3.19.</b> | OPS vitrifikasyonu görselleri. Embriyonun OPS payetine yüklenmesi (a, b, c ve d), LN'a daldırılması (e), vitrifiye olduktan sonra tıkaçının takılması (f), gobletlerin üst kapaklarının kapatılıp (g) LN tankında kanister içine yerleştirilmesi (h) | <b>52</b> |
| <b>Şekil 3.20.</b> | MP vitrifikasyon petrisinin şematiği                                                                                                                                                                                                                 | <b>53</b> |
| <b>Şekil 3.21.</b> | MP vitrifikasyonu görselleri. Embriyonun vitrifikasyon solüsyonu damlalarından aktarılması (a), MP üzerine yüklenirken makroskobik (b) ve mikroskobik (c ve d) görüntümleri                                                                          | <b>53</b> |
| <b>Şekil 3.22.</b> | Çözdürme işleminden önce yapılan hazırlık                                                                                                                                                                                                            | <b>55</b> |
| <b>Şekil 3.23.</b> | Çözdürme işlemi                                                                                                                                                                                                                                      | <b>56</b> |
| <b>Şekil 4.1.</b>  | Maturasyon sonrası kumulus ekspansiyonunun değerlendirilmesi                                                                                                                                                                                         | <b>57</b> |
| <b>Şekil 4.2.</b>  | Maturasyon medyumuna yüklenen immatür oositlerin (a) ve maturasyon sonrasında oositlerin görünümü (b)                                                                                                                                                | <b>58</b> |
| <b>Şekil 4.3.</b>  | Fertilizasyonun 7. günü embriyolar                                                                                                                                                                                                                   | <b>59</b> |
| <b>Şekil 4.4.</b>  | Vitrifikasyon gruplarındaki embriyoların çözdürme sonrası 0. saat ve 24. saat görüntümleri                                                                                                                                                           | <b>60</b> |
| <b>Şekil 4.5.</b>  | Vitrifikasyon gruplarının çözdürme sonrası 0. ve 24. saat re-ekspansiyon oranları ile çalışma gruplarının 24. ve 48. saat gelişim ve hatching/hatched oranları                                                                                       | <b>60</b> |

## TABLÖLER

|                   |                                                                                                                            |           |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tablo 2.1.</b> | Yavaş dondurma, klasik vitrifikasyon ve ultra hızlı vitrifikasyon yöntemleri arasındaki farklılıklar (Dhali ve ark., 2019) | <b>6</b>  |
| <b>Tablo 2.2.</b> | Farklı vitrifikasyon yöntemlerinin soğutma ve ısıtma hızları (Dhali ve ark., 2019)                                         | <b>16</b> |
| <b>Tablo 2.3.</b> | Vitrifikasyon sonrasında IVP sığır embriyolarının canlılık ve hatching oranları                                            | <b>27</b> |
| <b>Tablo 2.4.</b> | Vitrifiye edilen ve edilmeyen IVP sığır embriyolarının transfer sonrası gebelik oranları                                   | <b>28</b> |
| <b>Tablo 4.1.</b> | Kullanılan ovaryum sayısı ve elde edilen kalitelerine göre immatür oosit sayıları                                          | <b>57</b> |
| <b>Tablo 4.2.</b> | Maturasyon sonrası kumulus ekspansiyonunun değerlendirilmesi                                                               | <b>58</b> |
| <b>Tablo 4.3.</b> | Embriyo aşamalarının gruplara dağılımı                                                                                     | <b>58</b> |
| <b>Tablo 4.4.</b> | Çözdürülen vitrifiye embriyoların re-ekspansiyon, gelişim ve hatching+hatched oranları                                     | <b>59</b> |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|         |                                         |                                         |
|---------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| %       | Yüzde                                   |                                         |
| <       | Küçüktür                                |                                         |
| >       | Büyüktür                                |                                         |
| ±       | Standart sapma                          |                                         |
| °C      | Santrigrad derece                       |                                         |
| µl      | Mikrolitre                              |                                         |
| µm      | Mikrometre                              |                                         |
| ATP     | Adenozin Trifosfat                      |                                         |
| CPS     | Kapalı Uçlu Çekilen Payet               | Closed Pulled Straw                     |
| dk      | Dakika                                  |                                         |
| DMSO    | Dimetil sülfoksit                       | Dimethyl Sulphoxide                     |
| DNA     | Deoksiribonükleik Asit                  |                                         |
| DT      | Direkt Transfer                         | Direct Transfer                         |
| EG      | Etilen Glikol                           | Ethylene Glycol                         |
| ET      | Embriyo Transferi                       | Embryo Transfer                         |
| FBS     | Fetal Sığır Serumı                      | Fetal Bovine Serum                      |
| IETS    | Uluslararası Embriyo Transferi Derneği  | International Embryo Technology Society |
| IVC     | <i>In Vitro</i> Kültür                  | <i>In Vitro</i> Culture                 |
| IVD     | <i>In Vivo</i> Üretilen                 | <i>In Vivo</i> Derived                  |
| IVP     | <i>In Vitro</i> Üretilen                | <i>In Vitro</i> Produced                |
| KP      | Kriyoprotektan                          |                                         |
| LN      | Sıvı Azot                               | Liquid Nitrogen                         |
| M       | Molar                                   |                                         |
| ml      | Mililitre                               |                                         |
| mm      | Milimetre                               |                                         |
| MP      | Modifiye Payet                          |                                         |
| mRNA    | Mesajcı Ribonükleik Asit                |                                         |
| MVS1    | MP Vitrifikasyon Solüsyonu 1            |                                         |
| MVS2    | MP Vitrifikasyon Solüsyonu 2            |                                         |
| OPS     | Açık Uçlu Çekilen Payet                 | Open Pulled Straw                       |
| OPU     | Ultrason Rehberliğinde Oosit Toplanması | Ovum Pick Up                            |
| OVS1    | OPS Vitrifikasyon Solüsyonu 1           |                                         |
| OVS2    | OPS Vitrifikasyon Solüsyonu 2           |                                         |
| PBS     | Fosfat Tamponlu Tuzlu Solüsyon          | Phosphate Buffered Saline               |
| pH      | Potansiyel Hidrojen                     |                                         |
| PVP     | Polivinil Prolidon                      | Polyvinyl Pyrrolidone                   |
| sn      | Saniye                                  |                                         |
| TCM-199 | Doku Kültürü Medyumu 199                | Tissue Culture Medium 199               |
| v       | Hacim                                   |                                         |
| YÜT     | Yardımcı Üreme Teknikleri               |                                         |

## ÖZET

### Sığır Embriyolarının OPS ve Modifiye Payet Yöntemiyle Vitrifikasyonu

Dünyada son zamanlarda artan IVP sığır embriyolarına paralel olarak embriyo transferinin arttığı görülmektedir. Kriyoprezervasyon embriyo transferinin yaygınlaşmasında kilit bir noktadır. Kriyoprezervasyon yöntemlerinden vitrifikasyon, IVP sığır embriyoları söz konusu olduğunda ön plana çıkmaktadır. Yüksek başarı oranlarına sahip, uygun maliyetli ve kolay uygulanabilir vitrifikasyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Araştırmanın amacı, gelişmiş laboratuvar imkânlarına ihtiyaç duymadan sahada uygulanabilecek bir vitrifikasyon yönteminin başarısını değerlendirmektir. Geliştirilen modifiye payet (MP)'in etkinliği, OPS ve vitrifiye edilmeyen kontrol grubu ile kıyaslayarak değerlendirildi. Mezbaha ovaryumlarından elde edilen kaliteli oositler IVM, IVF ve IVC işlemlerine tabi tutuldu. Araştırmada OPS, MP ve Kontrol gruplarının herbiri için 25 embriyo kullanıldı. Vitrifikasyon grupları vitrifiye edilip çözdürüldükten sonra kültüre yüklenirken, kontrol grubu vitrifiye edilmeksizin kültüre devam etti. OPS grubunun vitrifikasyon solüsyonu %20 FBS (v/v), %16,5 EG (v/v), %16,5 DMSO (v/v) ve 0,5 M süktroz içeren TCM199 medyumuna iken, MP grubunun vitrifikasyon solüsyonu %20 FBS (v/v), %15 EG (v/v), %15 DMSO (v/v) ve 0,5 M süktroz içeren TCM199 medyumuydu. Çözdürme işlemi vitrifikasyon yöntemlerinde aynı olup 0,25 ml'lik payet içinde 38,5°C'de tek adımda yapıldı. Çözdürme solüsyonu olarak %20 FBS (v/v) ve 0,2 M süktroz içeren TCM199 medyumuna kullanıldı. Çözdürme sonrası OPS ve MP gruplarında sırasıyla 0. saat (%64 ve %72) ve 24. saat (%92 ve %100) re-ekspansiyon oranları arasında fark bulunmamıştır ( $P>0,05$ ). Çözdürme sonrası gelişim oranları OPS ve MP grubunda sırasıyla 24. (%60 ve %76) ve 48. saat (%68 ve %76) bulundu ( $P>0,05$ ). Araştırmada OPS, MP ve Kontrol grubunda sırasıyla 24. (%28, %48 ve %40) ve 48. saat (%36, %60 ve %52) hatching/hatched oranı belirlendi ( $P>0,05$ ). MP gereği OPS'e göre yüzdesel olarak yüksek hatching sonuçları vermesine rağmen çalışmadaki embriyo sayısının düşüklüğüne bağlı olarak bu fark istatistiksel olarak ispatlanamamıştır. Gelecek çalışmalarda daha yüksek sayıda embriyo kullanılarak bu tekniğin başarısına dair daha kapsamlı çalışmaların yapılması gereklidir. Ayrıca vitrifikasyon sonrası embriyoların transfer edilerek gebelik oranlarının değerlendirilmesi gerçek başarıyı ortaya koyacaktır. MP tekniğinin uygulaması OPS'e göre zor olduğu için belli bir el becerisi kazanıldıktan sonra kullanılması uygun olacaktır. Sahada vitrifiye embriyoların yaygınlaşması için karmaşık işlemler gerektirmeyen başarılı bir vitrifikasyon tekniğinin geliştirilmesi gereklidir.

**Anahtar Kelimeler:** Direkt transfer, *In vitro* embriyo, Sığır blastosist, Kriyoprezervasyon.

## ABSTRACT

### Vitrification of Bovine Embryos by OPS and Modified Straw Method

Recent studies have indicated a correlation between the increasing prevalence of embryo transfer and the rising number of IVP cattle embryos worldwide. The cryopreservation of embryos has emerged as a pivotal aspect contributing to the widespread adoption of embryo transfer techniques. In the domain of cryopreservation techniques, vitrification emerges as a leading method for IVP bovine embryos. There is a need for cost-effective and easily applicable vitrification methods with high success rates. The objective of this study was to assess the efficacy of a vitrification technique that can be utilised in field settings without the requirement for sophisticated laboratory facilities. The efficacy of the developed modified straw (MP) was evaluated in comparison with OPS and a non-vitrified control group. Quality oocytes obtained from slaughterhouse ovaries were subjected to IVM, IVF and IVC procedures. In the study, 25 embryos were used for each of the OPS, MP and Control groups. The vitrification groups were subjected to the process of vitrification, then thawed and loaded into culture, while the Control group was cultured without vitrification. The vitrification solution of OPS group was TCM199 medium containing 20% FBS (v/v), 16.5% EG (v/v), 16.5% DMSO (v/v) and 0.5 M sucrose, while the vitrification solution of MP group was TCM199 medium containing 20% FBS (v/v), 15% EG (v/v), 15% DMSO (v/v) and 0.5 M sucrose. Thawing process was the same in all vitrification groups and was performed in a single step at 38.5°C in 0.25 ml straws. TCM199 medium containing 20% FBS (v/v) and 0.2 M sucrose was used as thawing solution. After thawing, there was no difference between the 0 h (64% and 72%) and 24 h (92% and 100%) re-expansion rates in OPS and MP groups, respectively ( $P>0.05$ ). Post-thawing development rates were found at 24th (60% and 76%) and 48th hours (68% and 76%) in OPS and MP groups, respectively ( $P>0.05$ ). In the study, hatching/hatched rate was determined at 24th (28%, 48% and 40%) and 48th hours (36%, 60% and 52%) in OPS, MP and Control groups, respectively ( $P>0.05$ ). Despite the MP device demonstrating superior hatching outcomes in comparison to the OPS, the statistical significance of this discrepancy could not be substantiated, owing to the limited number of embryos utilised in the study. In future studies, more comprehensive studies should be conducted regarding the success of this technique using a higher number of embryos. Furthermore, the transfer of embryos following vitrification, in conjunction with the subsequent evaluation of pregnancy rates, will provide a more accurate assessment of the technique's efficacy. Given the greater complexity of the MP technique in comparison with OPS, it is recommended that its utilisation be reserved for those with a proven level of manual dexterity. The widespread adoption of vitrification techniques in the field is contingent upon the development of a successful method that does not necessitate complex procedures.

**Keywords:** Direct transfer, *In vitro* embryo, Bovine blastocyst, Cryopreservation.

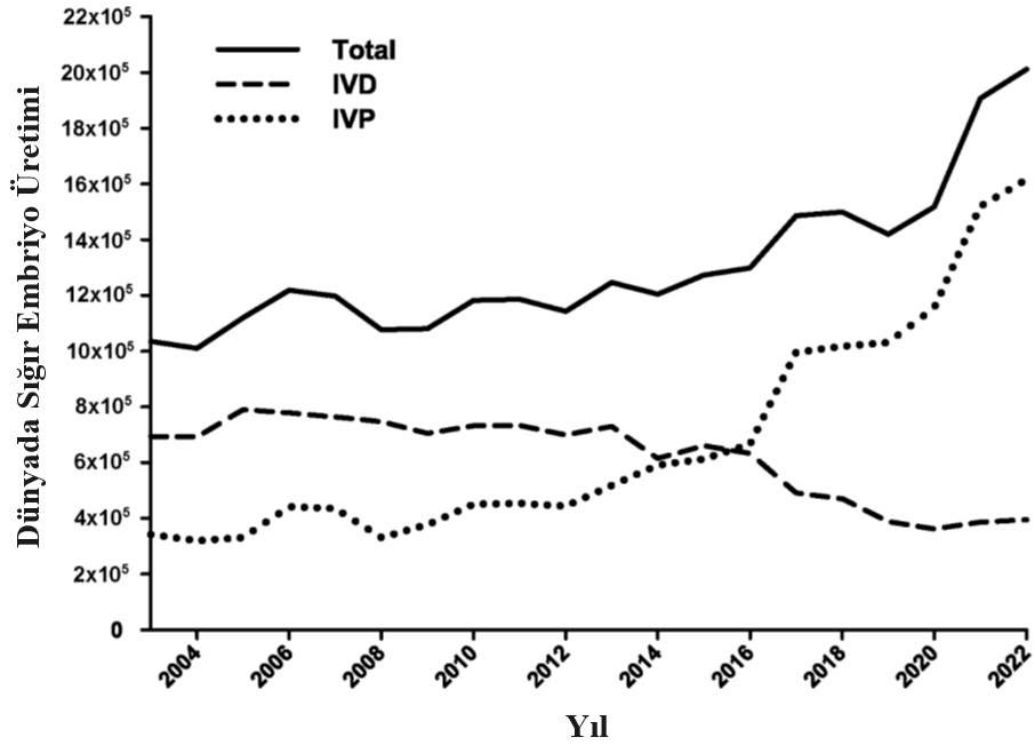
## 1. GİRİŞ

Türkiye istatistik kurumu (TÜİK)'nin 2023 verilerine göre hayvan varlığının (büyükbaş ve küçükbaş) %23,82'lik kısmını sığırlar oluşturmaktadır. Sığırlar et ve süt üretimi açısından hayvancılık ekonomisinde önemli bir paya sahiptir (TÜİK, 2023). Sığırlarda verimin artırılması genetiğin iyileştirilmesiyle mümkündür. Genetiğin iyileştirilmesi için en etkili ve hızlı yollardan birisi embriyo transferi (ET)'dir (Mebratu ve ark., 2020). Yenilikçi üreme biyoteknolojilerinin kullanılması, son yıllarda tarım ve hayvancılık alanının önemli ölçüde büyümesini sağlayarak çiftlik hayvanlarında verimliliği ve karlılığı artırmıştır. Çiftlik hayvanlarının ticari olarak yetiştirilmesinde ET, bir sürüdeki elit hayvanların sayısını artırmada veya sürü değişiminde önemli bir uygulamadır (Blondin, 2015).

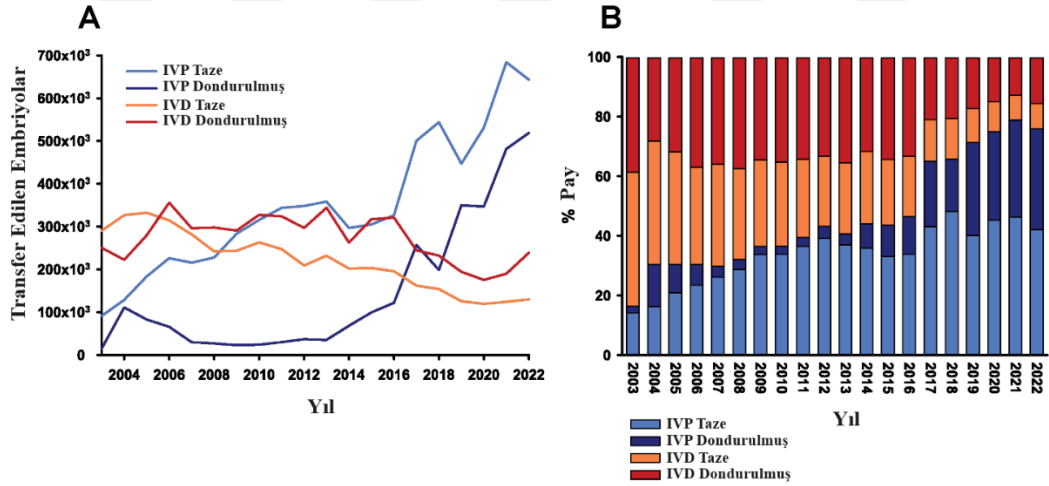
Sığır embriyoları, *in vivo* veya *in vitro* üretim yoluyla üretilir. *In vivo* yöntem ile sığır embriyolarının üretimi, ovaryum aktivitesini uyarmak için donörlere eksojen gonadotropin hormonlarının verildiği bir süperovülasyon tekniği kullanılarak yapılır. İneğin ovidukt kanalında fertilize olan oositler uterusu geçerek morula ve blastosist aşamasına geçerler. Uterusun yıkanmasıyla toplanan embriyolar *in vivo* üretilen (IVD) embriyolar olarak bilinir. Sığır oositleri mezbahada kesilen hayvanların ovaryumlarında bulunan foliküllerin aspirasyonu veya ovaryumlardan ultrason rehberliğinde oosit toplanması (OPU) tekniğiyle immatür olarak toplanabilir. *In vitro* maturasyona tabi tutulan oositler, genellikle dondurulmuş sperma kullanılarak *in vitro* fertilizasyona ve ardından blastosist aşamasına kadar *in vitro* kültür (IVC)'e bırakılır. Bu şekilde üretilen embriyolar, *in vitro* üretilen (IVP) embriyolar olarak bilinir. Sığır embriyoları üretildikten sonra alıcıların uterusuna transfer edilirse 'taze embriyo' olarak adlandırılır. Transfer edilmeyen embriyolar ise ileride kullanılmak üzere kriyoprezervasyon (dondurularak saklanması) yöntemi ile saklanabilmektedir (Do ve Taylor-Robinson., 2020; Sharma ve ark., 2024).

*In vitro* embriyo üretimi 1980'lerden beri yapılmasına rağmen 2000'lerin başlarında büyükbaş hayvan embriyolarının büyük çoğunluğu *in vivo* yöntem ile üretilmiştir (Merton ve ark., 2009). Uluslararası Embriyo Teknolojisi Derneği

(IETS) kayıtlarında ilk kez 2017 yılında, dünya çapında transfer edilen büyükbaş IVP embriyo sayısı, bir önceki yıla göre %49 artış ile IVD'lerden daha fazla olduğu bildirilmiştir. Dünyada 2022 yılında toplam 2.011.480 transfer edilebilir sığır embriyosu üretilmiştir (Viana, 2023). Üretilen transfer edilebilir sığır embriolarının %80,4'ü IVP embriolarıdır (Şekil 1.1). Transfer edilen toplam 1.558.482 sığır embriosunun %76,3'ünü IVP embrioları oluşturmuştur (Şekil 1.2; Viana, 2023). IETS verilerine göre 2022 yılında transfer edilen IVP embriyo oranı (%76,3; Viana, 2023) 2018 yılına (%65,8; Viana, 2019) göre %10,5 oranında artmıştır. Transfer edilen IVP embriolarının %44,2'si dondurulmuş %55,8'i ise taze olarak transfer edilmiştir (Şekil 1.2). Öte yandan, taze IVD embriyoları (%35,2) kıyasla daha fazla dondurulup çözündürülen IVD embriolar (%64,8) transfer edilmiştir (Viana, 2023). Günümüzde, IVD embrioların kriyoprezervasyonu rutin olarak ET'nin ticari programlarında kullanılmaktadır (Perry, 2015). Bu yüzden embriyo kriyoprezervasyonu, çiftlik hayvanlarının üstün genetik kaynaklarının depolanması, değişimi, ticarileşebilmesi ve taze transferi yapılamayan fazla embrioların korunması için anahtar bir uygulama olup (Almiñana ve Cuello, 2015), yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) önemli bir yönü haline gelmiştir (Leibo, 2008; Marsico ve ark., 2019). Kriyoprezervasyonun ayrıca dondurulmuş embrioların ülkelerarası nakliyatına kolaylık sağlaması, genetik olarak üstün hayvanların üretimini hızlandırması, ET'yi artırması, nesli tükenmekte olan türlerin genetik materyalini koruması, canlı hayvanların taşınmasından kaynaklanan sorunları önlemesi ve hastalık kontrolü gibi avantajları bulunmaktadır (Marsico ve ark., 2019; Özdaş ve ark., 2012).



**Şekil 1.1.** Yıllara (2003-2022) göre kaydedilen sığır embriyo (IVD, IVP ve toplam) sayısı (Viana, 2023).



**Şekil 1.2.** Kullanılan tekniğe (IVD veya IVP) ve embriyo tipine (taze veya dondurulmuş) göre 2003-2022 yılları arasında sığırlarda embriyo transferleri. (A) Transfer edilen embriyo sayısı. (B) Yıllık toplam embriyo transferlerinin yüzde payı (Viana, 2023).

Kriyoprezervasyon sayesinde embriyolar istenildiği aşamada dondurularak saklanabilir ve istenilen zamanda çözündürüldüğünde embriyolar kaldığı aşamadan tekrar gelişimine devam edebilmektedir. Sığır IVD ve IVP embriyolarının kriyoprezervasyonu için en yaygın kullanılan yöntemler, yavaş dondurma ve

vitrikfikasyondur (Do ve Taylor-Robinson., 2020; Marsico ve ark., 2019). Bu iki yöntemin avantaj ve dezavantajları vardır. Yavaş dondurmada düşük konsantrasyonda kriyoprotektan kullanıldığından embriyoların toksik hasar riskinin azalması, yöntemin uygulanabilirliğinin kolay olması, direkt transfer (DT) tekniğine uyarlanması ile suni tohumlama kolaylığında ET'ye izin vermesi ve ET sonrası gebelik oranlarının stabil hale getirilmesi gibi avantajları bulunmaktadır (Bondioli, 2014; Dhali ve ark., 2019; Gmez ve ark., 2020; Gordon, 2003). Bununla birlikte yavaş dondurma yönteminde nispeten pahalı bir dondurma cihazına ihtiyaç duyulması ve embriyolar üzerine yüksek hasar verici etkiye sahip hücre içi buz kristali oluşma ihtimalinin olması dezavantajdır. Vitrikfikasyon yönteminin avantajları ise pahalı cihaz ve ekipmana ihtiyaç duymaması, soğutma ve ısınma hızları yüksek olduğu için embriyoların tehlikeli sıcaklık aralığını (+15 ile -5 °C) hızlı bir şekilde geçmesi sağlanarak soğuk hasarının şekillenmesini azaltması ve hücre içi buz kristali oluşumunu elemine edebilmesidir (Dhali ve ark., 2019; Gmez ve ark., 2020). Vitrikfikasyon yönteminde yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan kullanıldığı için embriyoların sitotoksik etkiye ve osmotik basınca uğrama ihtimalinin olması, DT tekniğine daha zor uyarlanması ve ET sonrası gebelik oranlarının stabil hale getirilememesi gibi dezavantajları vardır (Gordon, 2003; Marsico ve ark., 2019). Embriyolar, dondurma ve zdrme sırasında hasar görebilmektedir (Estudillo ve ark., 2021). Bundan dolayı dondurulmuş embriyoların transferi sonrası gebelik oranları istenilen düzeyde değildir (Marsico ve ark., 2019; zdaş ve ark., 2012; Satılmış ve ark., 2014).

Dünya çapında embriyo üretiminde son zamanlarda *in vitro* embriyo üretiminin arttığı görülmektedir (Viana, 2023). Ancak *in vitro* sistemlerde ve embriyo kültür ortamındaki pek çok gelişmeye rağmen, blastosist verimi ve embriyo kalitesinde son on yılda önemli bir ilerleme kaydedilmemiştir. İn vitro kültür şartlarında olası zigotların %20 ila %40'ı blastosist aşamasına ulaşır (Ferr ve ark., 2020a, 2020b; Rizos ve ark., 2008). Bu IVP blastosistlerinin çoğu ET sonrası gelişimi sürdürememektedir. Son 25 yılda rapor edilen çalışmalara göre, IVP embriyo transfer edilen alıcı sığırların gebelik oranları, IVD embriyolarla karşılaştırıldığında %10 ila %40 daha düşüktür. Dolayısıyla bu sığırların yaklaşık

yalnızca %27'si IVP embriyolarından canlı bir buzağı üretecektir (Banliat ve ark., 2022; Ealy ve ark., 2019). Kültür koşulları IVP embriyolarının kalitesini ve gelişim yeteneğini olumsuz etkilediğı için kriyoprezervasyondan sonra sığır embriyolarının hayatta kalma yeteneğı, IVD embriyolara göre daha düşüktür (Ferr  ve ark., 2020b; Marsico ve ark., 2019; Rizos ve ark., 2008). Bununla birlikte IVP sığır embriyoları kriyohasara karşı IVD embriyolarına göre çok daha hassastır (Rizos ve ark., 2008). Araştırmacılar, IVP embriyolarının kriyoprezervasyonu için vitrifikasyonun  ne çıktığı konusunda fikir birliğıne varmışlardır (Kamoshita ve ark., 2024; Marsico ve ark., 2019; Mogas ve ark., 2024). Embriyoların kriyotoleransının artırılabilmesi için dondurma yöntemlerinin modifikasyonları, dondurmada kullanılan çeşitli kriyoprotektan ve katkı maddelerinin konsantrasyonları, dondurma öncesi ve sonrası embriyo kültürlerinde kullanılan antioksidan ve kimyasalların etkilerini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır (Khatun ve ark., 2019; Marsico ve ark., 2019).

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Embriyoların Kriyoprezervasyonu

Kriyoprezervasyonda tüm canlı hücreler için en önemli husus, hücre içi sıvının büyük bir kısmının donmadan önce hücre içinden uzaklaştırılmasıdır. Embriyo dondurmada kullanılan yöntemler üç ana başlık altında incelenmektedir. Bunlar; yavaş dondurma, hızlı dondurma, vitrifikasyon yöntemleridir (Gordon, 2003). Günümüzde embriyoların kriyoprezervasyonu için yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Tablo 2.1). Son yıllarda klasik vitrifikasyon prosedürlerine kıyasla daha yüksek soğutma-ısıtma oranı sağlayan modifiye bir teknik olan ultra hızlı vitrifikasyon yöntemi geliştirilmiştir (Dhali ve ark., 2019).

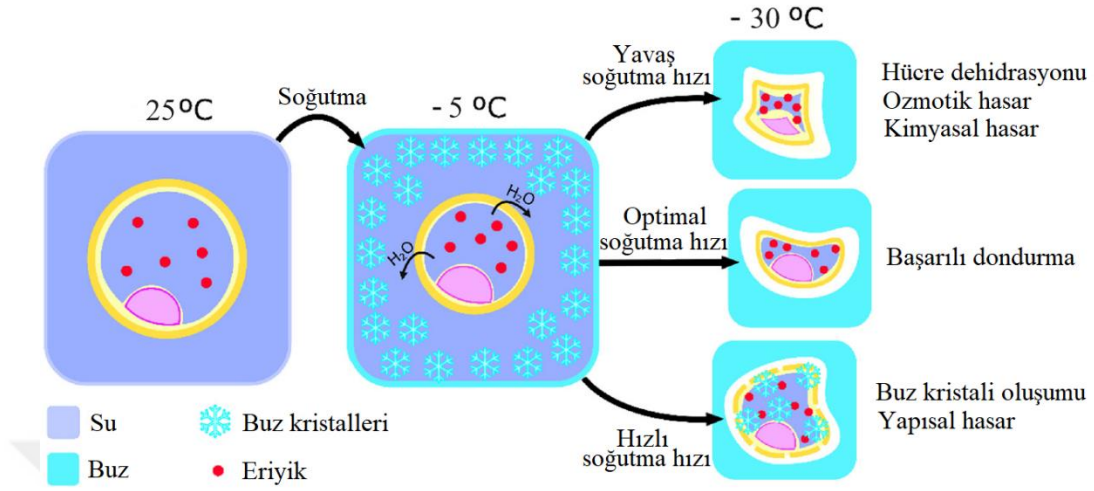
**Tablo 2.1.** Yavaş dondurma, klasik vitrifikasyon ve ultra hızlı vitrifikasyon yöntemleri arasındaki farklılıklar (Dhali ve ark., 2019).

| Ayrıntılar                         | Yöntemler                                                                           |                                                                                |                                                                                                                            |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                    | Yavaş Dondurma                                                                      | Klasik Vitrifikasyon                                                           | Ultra hızlı Vitrifikasyon                                                                                                  |
| Kriyoprotektanların konsantrasyonu | Düşük, 1-2 M                                                                        | Yüksek, 5-7 M                                                                  | Orta derece, 3,5- 5,5 M                                                                                                    |
| Numune hacmi                       | > 100 µl                                                                            | 50- 100 µl                                                                     | ≤ 5 µl                                                                                                                     |
| Soğutma prosedürü                  | Programlanabilir bir dondurma makinesi yardımıyla yavaş ve kontrollü soğutma sağlar | Dondurma makinesi gerekmez; numuneler doğrudan sıvı azot (LN) içine daldırılır | Dondurma makinesi gerekmez; numuneler doğrudan LN içine daldırılır veya LN sıcaklığına soğutulmuş bir yüzeye yerleştirilir |
| Numunenin işlem süresi             | Uzun, 2-3 saat                                                                      | Kısa, <10 dk                                                                   | Kısa, <10 dk                                                                                                               |
| Buz kristali oluşumu               | Var                                                                                 | Yok                                                                            | Yok                                                                                                                        |
| Ozmotik hasar olasılığı            | Düşük                                                                               | Yüksek                                                                         | Orta derece                                                                                                                |
| KP bağlı toksik hasar olasılığı    | Düşük                                                                               | Yüksek                                                                         | Orta derece                                                                                                                |
| Soğuk hasar olasılığı              | Yüksek                                                                              | Düşük                                                                          | Düşük                                                                                                                      |
| Numune kabı                        | Klasik 0,25 ml'lik payet                                                            | Klasik 0,25 ml'lik payet                                                       | Kapsız veya klasik payet dışındaki özel kaplar                                                                             |
| Sistem durumu                      | Kapalı                                                                              | Kapalı                                                                         | Kapalı veya açık                                                                                                           |
| Tecrübe gereksinimi                | Gerçekleştirilmesi kolay                                                            | Gerçekleştirilmesi zor                                                         | Gerçekleştirilmesi zor                                                                                                     |

### 2.1.1. Yavaş Dondurma Yöntemi

Yavaş dondurma, gametlerin ve embriyoların dondurularak saklanmasına izin veren ilk yöntemdir. Yıllar boyunca geliştirilen protokol hala embriyo kriyoprezervasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır (Ribeiro ve ark., 2022). Yavaş dondurma yöntemi, hücre dışı buz kristallerinin büyümesine ve hücreler içinde buz kristalleri oluşmadan hücrelerden su çekmesine izin vermek için sıcaklığın yavaş, kontrollü bir şekilde düşürülmesini içerir (Jones, 2021). Yavaş dondurma yönteminde  $-6^{\circ}\text{C}$ 'de ( $-5$  ila  $-7^{\circ}\text{C}$  aralığı) olan cihaza yerleştirilen embriyolar, ilk soğumaya maruz kalırlar (Bruyère ve ark., 2012; Hasler, 2002; Jones, 2021; Jung ve ark., 2024). İlk soğumadan 2 dk sonrasında uygulanan seeding işlemi sonucunda hücre su hacmini kaybederken çevresinde buz kristali oluşumu başlar. Seeding, embriyonun bulunduğu bölmeden uzak olacak şekilde hücre dışı ortamda buz kristali oluşumunu kasıtlı olarak indüklemektir. Dondurma cihazının bölmesinde 2 dk'lık bir dengeleme süresinden sonra, payetin embriyodan uzak bir kısmına LN ile soğutulmuş metal forseps veya swapla dokundurulularak seeding işlemi gerçekleştirilir. Seeding, payet içindeki sıvıda buz kristali oluşumunu uyarak buz kristallerinin payet boyunca yayılmasına neden olur. Su moleküllerinin buz kristallerine dönüşmesi embriyoları çevreleyen sıvıdaki çözünen madde ve KP konsantrasyonunu arttırmaktadır. Böylece hücrelerden ekstra su molekülleri çekilerek embriyonun daha fazla su kaybetmesi sağlanmaktadır. Embriyo içindeki artan KP konsantrasyonu, hücre içi sıvının donma noktasını azaltarak embriyoyu hücre içi buz kristali oluşumundan korur (Jones, 2021; Ribeiro ve ark., 2022). Yeterli KP konsantrasyonuyla birlikte bu prosedür, buz kristallerinin oluşumunun yalnızca hücre dışında gerçekleşmesini sağlayan bir yavaş soğutma hızına ihtiyaç duymaktadır. Yavaş soğutma hızının çok düşük olması, hücrenin sitoplazmasını dehidre ederek hücre içinde aşırı artan eriyik konsantrasyonlarına optimal süreden daha fazla maruz kalmasına neden olduğu için hücrenin ozmotik ve kimyasal hasara uğraması sonucunda hücre ölümüne yol açabilir. Öte yandan soğutma hızının yüksek olması, hücre içinde buz kristallerinin oluşma olasılığını artırarak yapısal hasara neden olur (Şekil 2.1). Bu nedenle optimal soğutma hızında olan prosedür, buz kristallerinin oluşumunun önlenmesi

ile hücre içindeki yüksek eriyik madde konsantrasyonlarının toksisitesi arasında dengeleyici bir yapıdadır (Ribeiro ve ark., 2022).



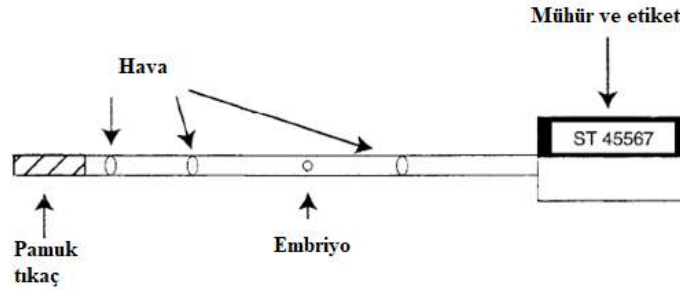
**Şekil 2.1.** Yavaş dondurma yönteminde soğutma hızının hücre kriyoprezervasyonundaki öneminin şematik gösterimi (Ribeiro ve ark., 2022).

Yavaş dondurmaya yönelik çok sayıda modern dondurma solüsyonları ticari olarak temin edilebilmektedir. Hücre içi KP olarak genelde gliserol 1,4 mol/l, Etilen Glikol (EG) 1,5 mol/l yoğunlukta kullanılır. Embriyolar EG içeren dondurma solüsyonu içine alındığında 10 dakika oda sıcaklığında dengelenmesine izin verilir (Bruyère ve ark., 2012; Jones, 2021; Nunes ve ark., 2024). Embriyolar 0,25 ml'lik payetlere yüklenirken ve soğutma işleminin ilk kısmı sırasında dengelenmeye devam edecektir. Dondurma solüsyonuna yerleştirilen embriyolar, solüsyonun hipertonik yapısı nedeniyle yüzecek ve KP'lar hücrelere girdikçe yavaşça batacaktır. Embriyolar dondurma solüsyonuna aktarılır aktarılmaz payet içine yüklenmeye başlanmalıdır. Günümüzde kullanılan yavaş dondurma yöntemi prosedürü maddeler halinde aşağıda verilmiştir (Jones, 2021).

1. Embriyolar 1,5 mol/l EG içeren yavaş dondurma solüsyonunda 10 dk oda sıcaklığında dengelenir. Embriyolar dengelenirken payet içine yüklenmesi tamamlanır.
2. Payetler, pamuk tıkaç altta kalacak şekilde ve dik olarak -6°C'de tutulan yavaş dondurma cihazına yerleştirilir.

3. Dondurma programı başlatılır ve 2 dk sonra payetlere seeding işlemi uygulanır. Seeding işlemi, embriyonun bulunduğu bölmeye yapılmamalıdır. Embriyonun bulunduğu bölmeden hava ile ayrılan üst bölmeye seeding işlemi yapılır. Embriyo  $-6^{\circ}\text{C}$ 'de toplamda 10 dk sabit tutulur.
4. Cihaz sıcaklığı  $-32^{\circ}\text{C}$ 'ye  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$  olacak şekilde düşürür (Jones, 2021).
5. Sıcaklık  $-32^{\circ}\text{C}$ 'ye düştüğünde payetler  $-32^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk bekletilir (Youngs, 2011) veya LN buharında 10 dk bekletilir (Hayashi ve ark., 2018).
6. Payetler LN içeren gobletler içine bırakılır (Jones, 2021).

Payete 1,5 mol/l EG içeren bir dondurma medyumunu ve ardından kısa bir hava bölmesi aspire edilir. Hava bölmesi, pamuk tıkaç için bir piston ve bariyer görevi görür (embriyolar pamuk tıkaçla temas ederse transfer sırasında dışarı atılmazlar). Başka bir kısa dondurma medyumunu ve bir hava bölmesi aspire edilir. Daha sonra EG'deki embriyo payete yüklenir (Şekil 2.2). Ardından bir hava bölmesi aspire edilerek payetin geri kalanı medyumla yüklenir (Hasler, 2002; Jones, 2021). Hava bölmelerinin, dondurma ve çözündürme sırasında bölmelerin karışmasını önleyecek kadar geniş olması önemlidir. Dondurma sırasında hava bölmeleri büzülür ve sıvı genişler, dolayısıyla dondurma-çözündürme işleminden sonra bölmelerin hareket etmesi alışılmadık bir durum değildir (Jones, 2021).



**Şekil 2.2.** Payet içine embriyonun yüklenmesi (Hasler, 2002).

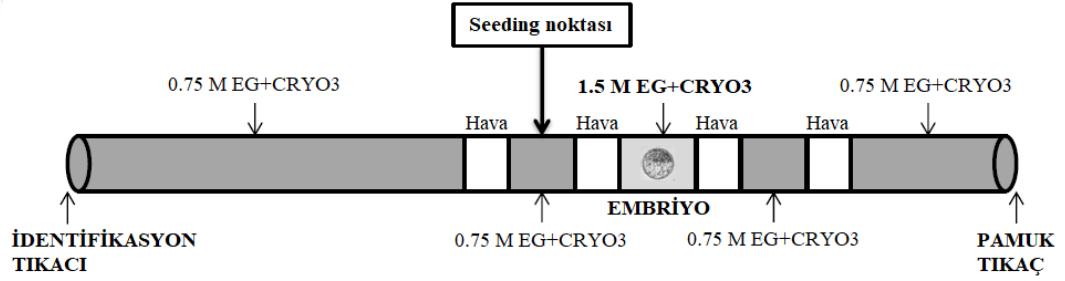
Kriyoprotektanlardan EG kullanılarak DT yönteminin ET endüstrisinin gelişmesi için güvenilir ve gelecek vaat eden bir yöntem olarak kullanılabileceği 1994 yılında bildirilmiştir (Gordon, 2003). Embriyonun çözöldürülerek aynı payette doğrudan bir ET kateterine yüklenmesine ve laboratuvar ihtiyacını ortadan kaldırarak suni tohumlama kolaylığında transfer edilmesine olanak sağlaması

DT'nin avantajıyken, embriyonun çözdürüldükten sonra hemen transfer edilmesi gerekliliği de DT'nin dezavantajıdır (Gordon, 2003; Jones, 2021). Sığır embriyoları EG (1,8 M) ile dondurulup DT edildiğinde tatmin edici gebelik ve doğum oranları bildirilmiştir (Dochi ve ark., 1995). Embriyolar, DT'ye uygun şekilde EG ile dondurulduğunda sarı renk payet, goblet ve kriyocanelerde etiketleriyle paketlenir. Gliserolde dondurulan embriyolar ise beyaz veya şeffaf gobletlerde ve beyaz kriyocane etiketlerinde paketlenir ve direkt yöntemle transfer edilmemelidir (Jones, 2021).

Payet tamamen havada çözdürüldüğünde embriyo canlılığı azalmaktadır. Payet doğrudan suda çözdürüldüğünde ise kırılan zona pellusida insidansı artmaktadır (Hasler, 2002; Rall ve Meyer, 1989). Yavaş dondurmanın erken aşamasında yavaş bir soğutma kullanılsa da son aşamada hızlı bir soğutma kullanıldığından dolayı hızlı çözdürme ihtiyacı oluşur. Eğer çözdürmenin yavaş yavaş gerçekleşmesine izin verilirse, çözdürme sırasında buz kristalleri oluşacak ve hücrel hasar meydana gelecektir. Hızlı çözdürme, tüm buzlar eriyene kadar embrioyu içeren payetin ılık (25–35 °C) suya aktarılmasıyla gerçekleştirilir. Eğer bu hızlı çözdürme LN'nin içinden payet çıkarılır çıkarılmaz başlarsa zona pellusida'da yüksek oranda hasar oluşabileceği gözlemlenmiştir. Ampirik çalışmalar, ılık suya aktarılmadan önce yaklaşık 30 sn boyunca havada bekletildiğinde zona pellusida hasarının görülme sıklığının azaldığını göstermiştir. Bu yaklaşımla, yaklaşık -60°C'nin üzerindeki kritik sıcaklık aşamasında ısınma hala hızlıdır ve çözdürme sırasında buz kristali oluşumuna bağlı hücrel hasar önlenir. Zona pellusida'nın çözüldükten sonra kırılması alışılmadık bir durum değildir. Hücre kütlesi sağlam olduğu ve embriyonun dondurulmadan önceki haline benzediği sürece embriyo hala canlı olduğu düşünülür. Embriyo, transfer medyumuyla birlikte payete yeniden yüklenir, payet embriyo transfer kateterine yerleştirilerek alıcının uterusuna transfer edilir (Jones, 2021).

Sığır IVP embriyoları için yeni bir dondurma/çözdürme prosedürü ortaya konmuştur. Yavaş dondurma solüsyonu olarak 1,5 M EG ve %20 CRYO3 (5617, Stem Alpha, Fransa) içeren Fosfat Tamponlu Tuzlu Solüsyon (PBS), payet içinde tek aşamalı çözdürme solüsyonu olarak ta 0,75 M EG ve %20 CRYO3 içeren PBS

kullanılmıştır. Stimüle edilmiş ineklerin oositlerinden elde edilen IVP ekspanded blastosistler, yavaş dondurma yöntemi ile dondurularak DT edildiğinde, gebeliğin 62. gününde düvelerde %57 ve ineklerde %40 oranında gebelik teşhis edilmiştir. Direkt transfere uygun olan yavaş dondurma (Şekil 2.3) ve vitrifikasyonun (fibreplug) yöntemlerinin taze IVP embriyoları ile kıyaslandığında benzer gebelik ve doğum oranları bildirilmiştir. Direkt transfer yönteminde hayvansal kökenli proteinlerin (Sığır serum albümin, fetal buzağı serumu gibi) yerine sentetik bir protein ikamesinin (CRYO3) kullanılması, hastalık riskinin ortadan kaldırılması ve saha koşullarında uygulanabilirliğin kolay olması gibi avantajlara sahip olduğu belirtilmiştir (Gómez ve ark., 2020).

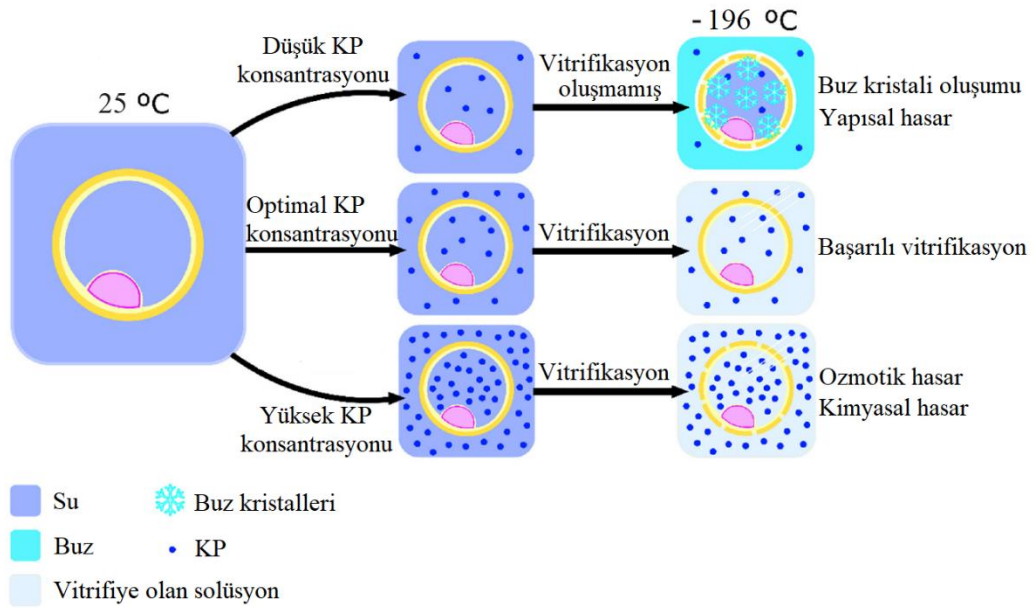


**Şekil 2.3.** Direkt transfere uygun yavaş dondurma yönteminin şematize hali (Gómez ve ark., 2020).

### 2.1.2. Vitrifikasyon Yöntemi

Vitrifikasyon; bir sıvının dondurulmaksızın soğumadan dolayı yoğunluğunun çok yükselmesi sonucunda cam benzeri bir hal alması olarak tanımlanmaktadır (Özatic, 2011). Vitrifikasyon yöntemi birçok avantaj sunmuştur. Hücre içi buz kristali oluşumunu tamamen ortadan kaldırmaktadır. Artan soğutma hızı sayesinde +15°C ila -5°C arasındaki tehlikeli bölgeyi hızla geçmektedir. Bundan dolayı hücre içi lipit damlacıklarının, lipit içeren zarların ve hücre iskeletinin soğuk hasarı görmesini azaltmaktadır. Vitrifikasyon yöntemi, pahalı dondurma cihazı ve ekipmana ihtiyaç duymadan yapılabilir. Ayrıca çok hızlı bir şekilde gerçekleştirildiği için zamandan tasarruf sağlamaktadır (Vajta, 2000).

Vitrifikasyon yöntemi; oda sıcaklığında embriyoların birkaç adımda artan konsantrasyonlarda (%50'ye kadar) olan solüsyonlar içinde optimal sürelerde maruz kalmasına dayanmaktadır. Vitrifikasyon solüsyonları çok yoğun olduğundan dolayı toksik etkiyi düşürebilmek için farklı KP'lar kullanılarak oluşturulur (Jang ve ark., 2017; Jones, 2021; Ribeiro ve ark., 2022). Yüksek konsantrasyondaki KP'ların iki temel amacı vardır: hücreleri dehidre etmek için ortamın viskozitesini arttırmak ve suyun kristalleşmesini önlemektir. Dolayısıyla bu teknik, KP'nın toksisitesi ve ortamdaki buz kristallerinin oluşumu arasında denge içermektedir (Şekil 2.4). Düşük KP konsantrasyonu vitrifikasyona izin vermez ve hücre içinde buz kristallerinin oluşmasına izin vererek yapısal hasara neden olur. Yüksek KP konsantrasyonu ozmotik hasarı ve ortam toksisitesini artırarak hücreye kimyasal hasar verir (Ribeiro ve ark., 2022).



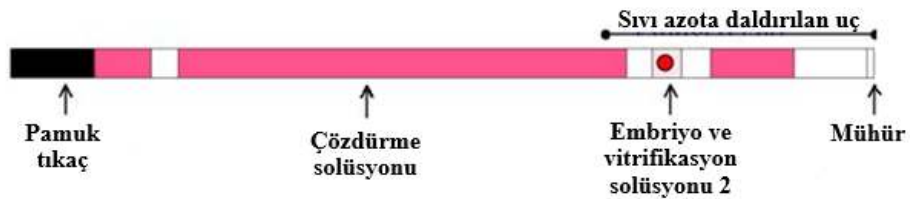
**Şekil 2.4.** Vitrifikasyon sürecinin şematik gösterimi ve hücre kriyoprezervasyonunu sağlamak için kriyoprotektan ajanların (KP'lar) önemi (Ribeiro ve ark., 2022).

Vitrifikasyon yöntemleri; klasik vitrifikasyon ve ultra hızlı vitrifikasyon olmak üzere 2'ye ayrılır (Dhali ve ark., 2019).

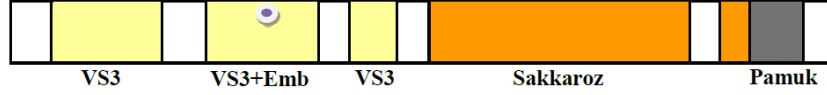
Klasik vitrifikasyon, yavaş dondurma yöntemine alternatif olarak 1980'lerin ortalarında Rall ve Fahy tarafından tanımlanan bir yöntemdir. Bu yöntem, buz

kristallerinin oluşumunu atlayarak cam benzeri bir durum içinde hücrenin ve hücre dışı ortamın katılaşmasına izin verir. İlk başarılı vitrifikasyon, 1985 yılında fare embriyolarında bildirilmiştir (Rall ve Fahy, 1985). Klasik vitrifikasyonda embriyolar, artan konsantrasyonlardaki KP solüsyonlarına gerekli süre maruz bırakıldıktan sonra son adımdaki solüsyonla birlikte payet içine yüklenir. Daha sonra payet, doğrudan LN içine daldırılır. Klasik vitrifikasyon, 5-7 M'lik bir KP konsantrasyonu ve yaklaşık 2500°C/dk'lık bir soğutma hızı ile gerçekleştirilebilir. Vitrifikasyonun en önemli avantajı, donma hasarı riskinin düşük olmasını ve yüksek embriyo canlılık oranını sağlamasıdır (Dhali ve ark., 2019; Mogas ve ark., 2024).

Vitrifikasyon ve çözdüme işleminin laboratuvar ortamında deneyimli kişiler tarafından yapılması gerekir. Bu yüzden vitrifikasyon, büyükbaş hayvan uygulamaları için DT'ye uygun yavaş dondurmaya göre daha az tercih edilmiştir (Jones, 2021). Bununla birlikte IVP embriyoların dondurma hasarına IVD embriyolara göre daha hassas olduğu bilinmektedir (Ferré ve ark., 2020b; Rizos ve ark., 2008). Birçok araştırmacı vitrifikasyon yöntemini özellikle IVP embriyolarında tercih etmektedir (Ferré ve ark., 2020b; Marsico ve ark., 2019; Mogas ve ark., 2024). Klasik vitrifikasyon yöntemini DT prosedürüne uyarlamak için (Şekil 2.5 ve 2.6) çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Campos-Chillon ve ark., 2006; Satılmış ve ark., 2014). Klasik vitrifikasyonun DT'ye uyarlanması IVP blastosistleri için çok etkili bulunduğu ancak morulalar için etkili bulunmadığı bildirilmiştir (Campos-Chillon ve ark., 2006). Bununla birlikte payet içi çözdüme işleminde; payetin sallanmasıyla embriyo ile sakkaroz solüsyonlarının arasında yoğun hava kabarcıklarının oluşmasından dolayı embriyonun sakkaroz solüsyonuyla yeterince karışmadığı bildirilmiştir (Satılmış ve ark., 2014).



**Şekil 2.5.** Direkt transfer prosedürüne uygun vitrifiye edilecek payet (Campos-Chillon ve ark., 2006).



**Şekil 2.6.** Direkt transfer tekniğine uygun payette vitrifikasyonun şematize hali (Satılmış ve ark., 2014).

Sığırlarda ticari ET endüstrisinde yavaş dondurma protokolleri yaygın olarak kullanılsada, kriyoprezervasyon maliyetlerini azaltabilen vitrifikasyon yöntemini uygun bir alternatif olarak gören araştırmacılar da bulunmaktadır. Vitrifikasyon (%56) ve yavaş dondurma (%44) ile kriyoprezerve edilen IVD embriyoların transferinden sonra gebelik oranlarının benzer olduğu bildirilmiştir (Gordon, 2003). Vitrifikasyon yöntemlerinin transfer süresinde daha fazla zaman esnekliğine izin verdiği için avantajlı olduğu düşünülmüştür (Gordon, 2003; Inaba ve ark., 2011). Vitrikiye edilen embriyolar çözündürüldükten sonra 15 dk boyunca payet içinde saklanabilirken, yavaş dondurulmuş embriyolar için genel tavsiye hemen transfer edilmesidir (Gordon, 2003). Vitrifikasyonun yavaş dondurmaya bir alternatif sunduğunu gösteren bulguları genişletmek için büyük ölçekli saha denemelerinin gerekli olacağı belirtilmiştir (Mogas ve ark., 2024).

Vitrifikasyonun gerçekleşmesi için üç önemli faktör vardır: (1) KP solüsyonunun yoğunluğu, (2) soğutma ve ısıtma hızı ve (3) vitrikiye edilen hacim. Başarılı vitrifikasyon elde etmek için bu faktörler arasında hassas bir denge sağlanmalıdır (Jang ve ark., 2017). Bu faktörler ele alınarak vitrifikasyon başarı olasılığı tasarlanmıştır (Yavin ve Arav, 2007; Şekil 2.7).

$$\text{Vitrifikasyon olasılığı} = \frac{\text{Soğutma ve ısıtma hızı} \times \text{Viskozite}}{\text{Hacim}}$$

**Şekil 2.7.** Vitrifikasyon başarı olasılığı formülü (Yavin ve Arav, 2007).

Ultra hızlı vitrifikasyon, klasik vitrifikasyon prosedürünün modifiye ve geliştirilmiş versiyonudur (Dhali ve ark., 2019). Vitrifikasyonun gerçekleşebilmesi için soğutma hızının 1000°C/dk veya daha çok hızlı düzeyde olması gerekir. Doğrudan LN'ye aktarılsa bile bu soğutma hızlarına ulaşmak için yüzey alanı/hacim oranının 0,25 ml'lik payetten daha büyük olması gerekir. Oosit ve embriyoların

kriyoprezervasyonu için ultra hızlı soğutma kavramı, Vajta ve arkadaşları tarafından açık uçlu çekilen payetin (OPS) icadı ile tanıtılmıştır. Bu, 0,25 ml'lik payetin yavaşça ısıtılması ve çok daha küçük bir çap elde edilecek şekilde çekilmesi ve böylece yüzey alanı/hacim oranının arttırılmasıyla gerçekleştirilir (Vajta ve ark., 1998a).

Sığır IVP embriyoları, soğumaya karşı aşırı duyarlı olduğundan kriyoprezervasyon işlemleri zor olmaktadır (Gordon, 2003; Mogas ve ark., 2024). Bu sorunu en aza indirmenin bir yolu, hasarın görülebileceği sıcaklık bölgesini olabildiğince hızlı bir şekilde geçmektir (Vajta ve ark., 1998b). Sığır IVP embriyo vitrifikasyonun etkinliği, soğutma ve ısıtma hızları artırılarak büyük ölçüde geliştirilmiştir. Bu amaçla geliştirilen teknikler, damlacıkların LN içine doğrudan daldırılmasını ve destek sağlamak için bir elektron mikroskop ızgarası, OPS, Kapalı uçlu modifiye payet (CPS), katı yüzey vitrifikasyon, cryoloop, cryotop, cryoleaf, vitrifikasyon spatulası, cryotip, yüksek güvenilir vitrifikasyon gibi yöntemlerin kullanımını içermektedir (Dhali ve ark., 2019; Jones, 2021; Saragusty ve Arav, 2011). Bu yöntemler minimum miktarda vitrifikasyon solüsyonu içerisinde embriyonun yerleştirilebileceği çeşitli platform veya taşıyıcılardan oluşur. Yüksek bir yüzey alanı/hacim oranı oluştururlar ve doğrudan LN'ye yerleştirildiğinde ultra hızlı soğutma sağlarlar. Tüm bu taşıyıcılar embriyonun LN'ye maruz kalmasına neden olur. Soğutma tamamlandıktan sonra embriyo ve taşıyıcı, kapatılabilen bir tür dış kap içine de yerleştirilebilir. Ultra hızlı soğutmayla sonuçlanan yüksek yüzey alanı/hacim oranı prensibi, sıcak çözündürme solüsyonuna yerleştirildiğinde ultra hızlı çözündürmeyle sonuçlanmaktadır. Çözündürme solüsyonları, hızlı ısı transferini sağlamak ve KP'ların çıkarılması sırasında hücresel şişmeyi kontrol etmek için tipik olarak süktroz solüsyonundan oluşmaktadır (Jones, 2021).

Ultra hızlı vitrifikasyon yöntemi, yavaş dondurma veya klasik vitrifikasyon yöntemlerine kıyasla son derece yüksek soğutma ve ısıtma hızlarına sahiptir (Tablo 2.2). Bu yöntem, son derece yüksek soğutma hızı kullanarak nispeten düşük konsantrasyondaki KP solüsyonunun vitrifikasyonuna izin verir. Böylece vitrifikasyon solüsyonunda kullanılan KP konsantrasyonunun düşürülmesiyle hücrelerde meydana gelen toksik etkiyi ve ozmotik stresi azaltır. Ultra hızlı

vitritfikasyon hızı, vitritfiye edilecek olan solüsyon hacminin azaltılmasıyla elde edilir. Yapılan derlemelerde, farklı memeli türlerindeki embriyoların bu yöntemle kriyoprezervasyonu sonrasında yüksek canlılık oranları bildirilmiştir. Bu yüzden günümüzde ultra hızlı vitritfikasyon yönteminin en iyi yöntem olduğu düşünülmektedir (Dhali ve ark., 2019; Mogas ve ark., 2024).

**Tablo 2.2.** Farklı vitritfikasyon yöntemlerinin soğutma ve ısıtma hızları (Dhali ve ark., 2019).

| Kriyoprezervasyon yöntemleri | Soğutma hızı                                                                                                           | Isıtma hızı  |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Yavaş dondurma               | -5 ila -7°C'ye kadar 1-2°C/ dk<br>takiben -30 ila -70°C'ye kadar<br>0,3-1°C/dk ve ardından örneği LN<br>içine daldırma | 250-600°C/dk |
| Klasik vitritfikasyon        | 2.000-2.500°C/dk                                                                                                       | 250-600°C/dk |
| Ultra hızlı vitritfikasyon   |                                                                                                                        |              |
| OPS                          | 20.000°C/dk                                                                                                            | 20.000°C/dk  |
| CPS                          | 8.100°C/dk                                                                                                             | -            |
| Elektron mikroskopik ızgara  | 180.000°C/dk                                                                                                           | -            |
| Cryoloop                     | 15.000°C/dk                                                                                                            | 45.000°C/dk  |
| Yarım payet                  | > 20.000°C/dk                                                                                                          | -            |
| Cryotop                      | 23.000°C/dk                                                                                                            | 42.000°C/dk  |
| Cryotip                      | 12.000°C/dk                                                                                                            | 24.000°C/dk  |
| Kuvars mikro kapillar        | 250.000°C/dk                                                                                                           | -            |
| Cam kapillar                 | 12.000°C/dk                                                                                                            | 62.000°C/dk  |

Oda ısısında (20-25°C) vitritfikasyonun gerçekleşmesi için KP konsantrasyonunun, yavaş dondurma yönteminde kullanılan KP'den daha yüksek olması gerekir. Sığır embriyoları için kullanılan vitritfikasyon solüsyonlarının çoğunluğu, iki veya daha fazla hücre içi KP'nın ve süktroz veya trehaloz gibi hücre dışı bir KP'nın kombinasyonundan oluşur. Sığır embriyoları için tipik bir vitritfikasyon solüsyonu %15-20 EG, %15-20 Dimetil sülfoksit (DMSO) ve 0,3-0,5 mol/l süktroz veya trehalozdan oluşacaktır. Vitritfikasyonda kullanılan EG ve DMSO'nun kombine konsantrasyonları, yavaş dondurma için kullanılan EG veya gliserol konsantrasyonunun en az üç katıdır. Yüksek KP konsantrasyonlarına embriyoların uzun süre maruz kalması toksik etkili olabilir. Bu nedenle embriyolar adım adım daha yüksek konsantrasyonlara maruz bırakılır (Jones, 2021). Son adımdaki vitritfikasyon solüsyonuna maruz kalma süresi ortalama 45 (20-60) sn ile sınırlıdır (de Camargo ve ark., 2022; Martínez-Rodero ve ark., 2021; Vargas Reyes ve Chacón Jaramillo, 2016).

Vitrifikasyon yöntemi IVP embriyolarında öne çıkan bir yöntem olduğu halde direkt transfere uygun olan yavaş dondurma yöntemi kadar yaygın olarak kullanılmamıştır. Vitrifikasyon yöntemini direkt transfere uygun hale getirmek için araştırmacılar, petri içinde iki adımda (0,3 M ve 0,15 M), payet içinde iki adımda (0,3 M ve 0,15 M) veya tek adımda (0,15 M süktroz) çözündürme işlemini kıyaslamışlardır. Tek adımda payet içinde çözündürülen embriyolar diğer gruplara göre daha yüksek hücre sayısı ve daha düşük apoptoz indeksi göstermiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, sığır embriyolarının çoğu vitrifikasyon gereciyle uyumlu olarak tek adımda payet içinde çözündürülerek direkt transfer edilmesiyle etkinliği yüksek ve pratik olan bir protokol oluşturduklarını bildirmişlerdir. Bu protokolün yavaş dondurmanın yerini alabileceği ifade edilmiştir (Oliveira ve ark., 2020).

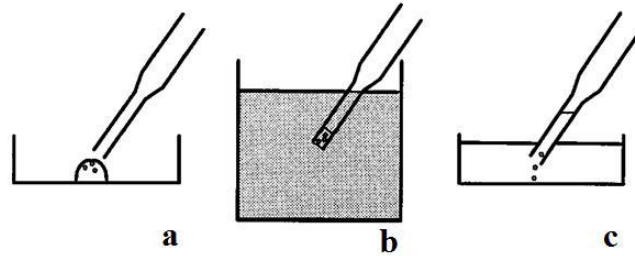
Minimum hacim soğutma sağlayan cryotec vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan IVP sığır embriyolarının tek adımlı payet içerisinde çözündürülmesinde farklı süktroz konsantrasyonları (0,5 mol/L, 0,3 mol/L ve 0,2 mol/L) araştırılmıştır. Tek adımda payet içinde çözündürmede kullanılan 0,3 mol/L süktroz grubundaki embriyoların canlılık oranı (%100, 60/60), 0,5 mol/L (%88,3, 53/60) ve 0,2 mol/L (%87,9, 51/58) süktroz gruplarına göre önemli derecede yüksek bulunmuştur (Tajimi ve ark., 2018).

Fibreplug vitrifikasyon yöntemiyle dondurularak tek adımda (0,25 M süktroz) çözündürülen embriyolar ile taze sığır IVP embriyolarının alıcı hayvana transfer edilmesinde aynı gebelik oranlarının [%41,6 (5/12)] elde edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, fibreplug vitrifikasyonu ile dondurulup payet içinde tek aşamalı çözündürülen embriyonun uygun saha koşullarında DT edilebileceğini belirtmişlerdir (Caamaño ve ark., 2015).

## 2.2. Ultra Hızlı Vitrifikasyonda Kullanılan Modifiye Gereçler

### 2.2.1. OPS Vitrifikasyonu

OPS, buz kristallerinin büyümesi olmadan ultra hızlı donmayı sağlamak için tasarlanmıştır. Vajta tarafından geliştirilen yöntem, klasik payet çapını azaltarak vitrifiye edilecek solüsyonun hacminin de azaldığı ve daha hızlı bir soğutma oranı sağladığı kavramına dayanmaktadır. Bir mini payet, iç çapı 1,7 mm'den 0,8 mm'ye ve duvar çapını 0,15 mm'den yaklaşık 0,07 mm'ye düşürmek için ısıtılarak çekilir (Vajta ve ark., 1998a). Standart payetlerin çapının yarıya düşürülmesi, soğutma hızının 10 kat artırılması, vitrifikasyon ve maruz kalma süresi için gerekli KP solüsyon konsantrasyonunun %30 azaltılması ile geliştirilmiştir. Yöntemde 1-2 µl'lik yükleme hacimleri kullanılır. Hücreler, payetin ince ucu hücreleri içeren vitrifikasyon solüsyonuna dokundurularak kılcal etki ile payet içine yüklenir (Şekil 2.8). Bu yöntemle elde edilen soğutma ve ısınma oranlarının sırasıyla 16.700 °C/dk ve 13.900 °C/dk olduğu tahmin edilmektedir. Bu yaklaşım toksik, ozmotik ve donma hasarı olasılığını azaltır (Malik ve ark., 2022).

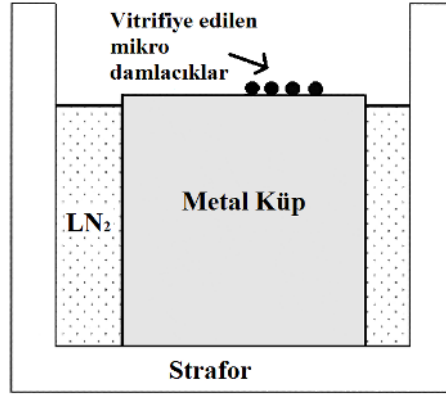


**Şekil 2.8.** OPS. (a) Hücrelerin OPS payetine yüklenmesi. (b) OPS payetinin LN içine daldırılması. (c) OPS payetinin çözündürülmesi (Vajta ve ark., 1998a).

### 2.2.2. Katı Yüzey Vitrifikasyonu

Katı yüzey vitrifikasyonu, sıgır oositlerinin etkili bir şekilde kriyoprezervasyonu, partenogenetik aktivasyon, *in vitro* fertilizasyon, nükleer transferin araştırılması ve uygulanması için tasarlanmıştır. Alüminyum folyoyla kaplanmış metal bir küp, yüzey yaklaşık -150°C'ye ulaşacak şekilde kısmen LN'ye batırılır. Oositleri içeren vitrifikasyon solüsyonunun mikro damlaları metal küpün

soğuk üst yüzeyine damlatılır ve anında vitrifiye edilir (Şekil 2.9). Vitrifiye edilmiş mikro damlalar daha sonra LN'de depolanır (Dinnyés ve ark., 2000; Güler, 2018; Malik ve ark., 2022).



**Şekil 2.9.** Katı yüzey vitrifikasyonu (Dinnyés ve ark., 2000).

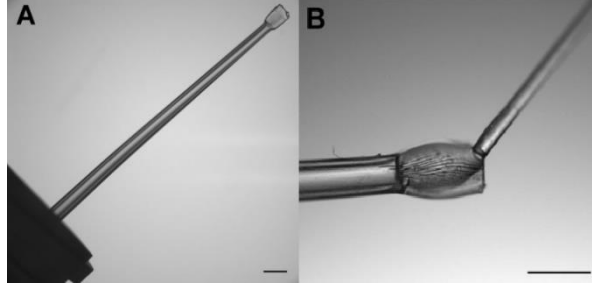
### 2.2.3. Cam Mikropipet

Cam mikropipet, kapillar cam pipetin orta kısmının 1,0 mm'den 0,3 mm'ye azaltılncaya çekilip, en dar yerinden kesilerek elde edilmiştir. Dar kısma (10 mm uzunluğundaki) yüklenen hacim cam mikropipette 0,14 mm<sup>3</sup> iken OPS'de 2,68 mm<sup>3</sup> olduğu bildirilmiştir. Cam mikropipette vitrifiye edilen hacim OPS'ye göre daha küçük olduğundan dolayı vitrifikasyonda cam mikropipetin daha avantajlı olduğu düşünülmüştür (Cho ve ark., 2002; Kong ve ark., 2000).

### 2.2.4. Vitrifikasyon Spatulası

Ucuz ve montajı kolay olan vitrifikasyon spatulası, ticari vitrifikasyon gereçlerine alternatif olarak fare embriyolarının vitrifikasyonu için bildirilmiştir (Tsang ve Chow, 2009). Kolay kullanım sağlayan bu gereç, yalnızca hücrelerin ultra hızlı soğutulmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda vitrifiye edilmiş hücreleri kapalı bir sistemde saklar. Otoklavlanmış bir mikropipet ucunun uç kısmı hafifçe ısıtılmış bir çift ince forsepsle ezilir ve 1 mm<sup>2</sup>'lik taç yaprağı benzeri bir plaka oluşturulur. Sıvı sızmasını önlemek için distal kenar ısıyla kapatılır. Spatula sapını kısaltmak için mikropipet ucunun diğer tarafının ucu kesilir. Kesilen uç,

ısıyla bir kriyojenik şişe kapağının alt tarafına monte edilir (Şekil 2.10) (Tsang ve Chow, 2009).



**Şekil 2.10.** Vitrifikasyon Spatulası. (A) İnce plaka sağ üstte ve takılı olduğu kriyo şişe kapağı sol altta. (B) Embriyoların vitrifikasyon spatulasına yüklenmesi (Tsang ve Chow, 2009).

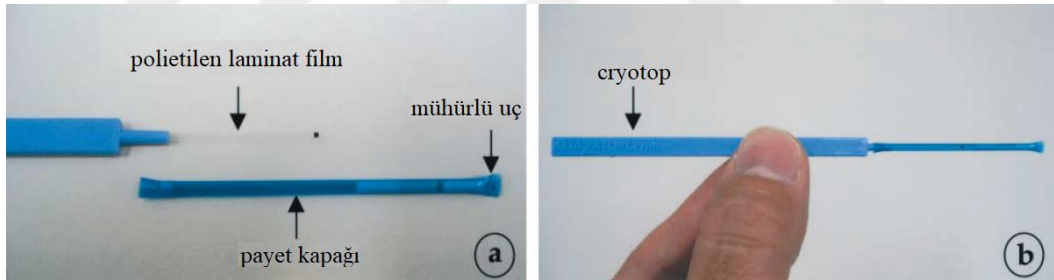
#### 2.2.5. Ticari Ultra Hızlı Vitrifikasyon Gereçleri

Cryoloop, kriyovialin kapağına yerleştirilen paslanmaz çelik boru üzerine monte edilmiş küçük bir naylon looptur. Bu loop, 20 µm genişliğinde olup 0,5-0,7 mm çapındadır. Blastosistler, ince bir kriyoprotektan solüsyon filmi tabakası ile kaplanan loopun üzerine yerleştirilir (Şekil 2.11). Cryoloop üzerindeki blastosistler, LN<sub>2</sub> ile doldurulan kriyoviyal içine yerleştirilerek kriyoviyalin kapağı kapatılır (Lane ve ark., 1999). Cryoloop kullanılarak oositlerin vitrifikasyonu, geleneksel vitrifikasyon işlemlerine göre avantajlara sahiptir, çünkü 1 µl'den daha küçük hacim sağladığı için soğutma sırasında hızlı ve düzgün ısı değişimine izin verir (Saki ve Ghalambor Dezfuly, 2005). Bu yaklaşım, 0,1 µl yükleme hacmi ile 700.000°C/dk kadar soğutma oranları üretebilir (Malik ve ark., 2022).



**Şekil 2.11.** Cryoloop (Saki ve Ghalambor Dezfuly, 2005).

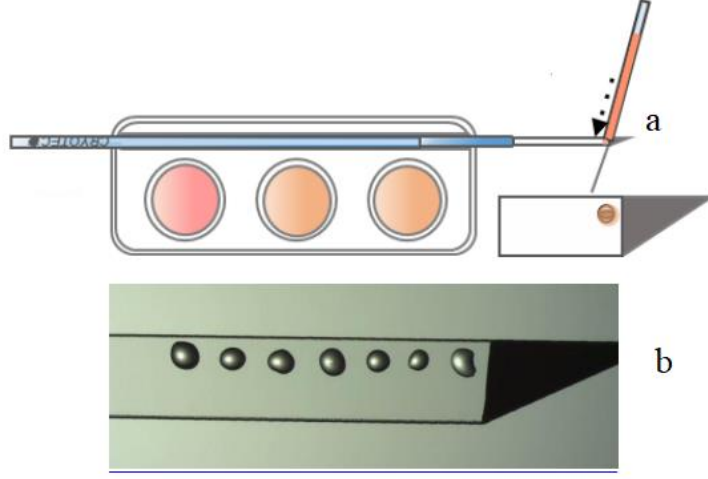
Kuwayama tarafından Japonya’da geliştirilen sert bir tutucuya tutturulmuş dar, polietilen laminat filmden yapılmış ince bir şeridden (0,4-0,7 mm genişlik, 20 mm uzunluk ve 0,1 mm kalınlık) oluşan özel bir gereç olan Cryotop mekanik hasarlardan korunmak için 3 cm uzunluğunda plastik kapak ile kapatılabilir (Şekil 2.12). Cryotop, minimum hacim soğutma ile yüksek soğutma (23.000 °C/dk) ve ısınma (42.100 °C/dk) oranlarıyla çalışır (Hiraoka ve ark., 2004; Kuwayama, 2007; Malik ve ark., 2022). Bu yöntem yaygınlaşarak en çok satan mikro hacim depolama gereci olmuştur. Cryotop dizaynı, vitrifikasyon solüsyonu hacminin azaltılmasını, buz kristali çekirdeklenmesini ve büyüme riskini düşürürken soğutma-ısınma hızlarını artırması fikrine dayanmaktadır. Vitrikiye edilecek hacim ( $<0,1 \mu\text{l}$ ), film şeridinin üstüne inceltilmiş cam pastör pipeti ile yüklenir. Daha sonra KP çıkarılır ve hücrelerin vitrikiye edilmesi için yeterli ince bir tabakanın arkasında bırakılır. Cryotop vitrifikasyon yöntemi, hayvan hücresi teknolojisinin çeşitli alanlarında başarıyla uygulanmıştır. Beşerî yardımcı üreme tekniklerinde yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Malik ve ark., 2022).



**Şekil 2.12.** Cryotop. (a) Polietilen laminat film ve payet kapağı, (b) payet kapağı ile kapanan Cryotop (Hiraoka ve ark., 2004).

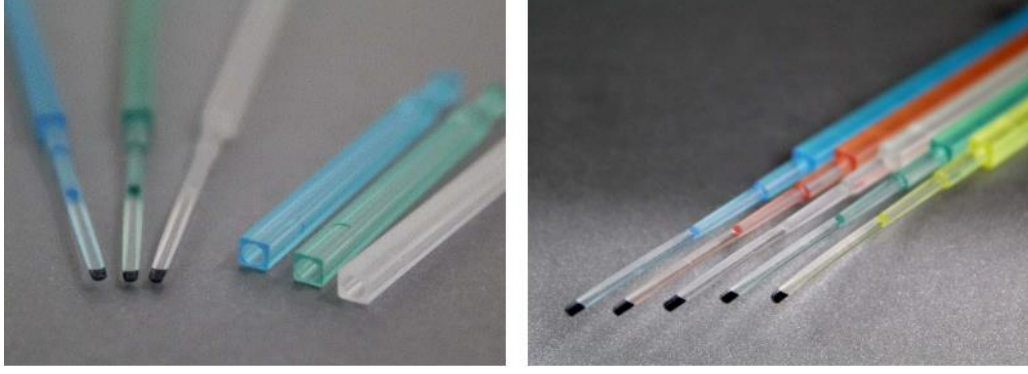
Cryotech vitrifikasyon yöntemi kullanılarak, insanlarda oosit canlılık oranı %97,1 (Kagalwala ve ark., 2013), sığırlarda embriyo canlılık oranı %100 ve gebelik oranı %46,8 olarak elde edilmiştir (Gutnisky ve ark., 2013). Güvenli kullanım ve depolama için, bu vitrifikasyon gereci bir polipropilen şeridi ve koruyucu bir kapağa bağlanmış plastik bir sap içerir (Şekil 2.13). Bu yöntem açık veya kapalı (kapağı kapatılarak) şekilde soğutma için kullanılabilir (Malik ve ark., 2022). Cryotech üzerine yüklenen damlacığı en aza indirmeye çalışırken, yüzey gerilimi nedeniyle oosite/embriyoya baskı uygulanabilir. Bu, oosite/embriyoya zarar verebilir veya tabakaya yapışmasına neden olarak çözülme sırasında çıkarılmasını

zorlaştırabilir. O yüzden bu yöntemde damlacık aşırı büyükse veya iki ve daha fazla oosit/embriyo tek bir damlacık içine yerleştirilmişse, pipete yeniden aspire edilerek cryotech üzerinde farklı bir yerinde yeni bir damlacık yapılması önerilir (Anonim 2024a).



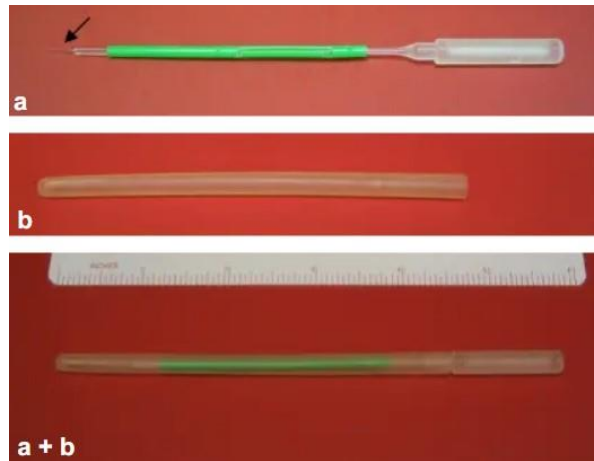
**Şekil 2.13.** Cryotech. (a) Cryotech üzerine hücrenin yüklenmesi şematığı, (b) üzerine hücreler yüklenmiş cryotech görünümü (Anonim 2024a).

Cryolock, dört düz yüzeye sahip kare çubuk şeklinde bir gereçtir. Oda sıcaklığında ve düşük kriyojenik sıcaklıklarda hem kapak hem de gövdesi aynı genişleme katsayısına sahip olduğundan güvenli bir bağlantı sağlanır. Gövdenin ve kapağın uç kısımlarındaki boşluklar, manipülasyon sırasında forseps ile kolay tutuşa olanak tanır. Hücreyi diğer yüzeylerle temastan koruyan ve hücrenin kaybını veya hasarını önleyen, oositlerin veya embriyoların yerleştirildiği içbükey bir uca sahiptir (Şekil 2.14). Tasarımı, Cryolock gövdesinin ve kapağının mükemmel bir şekilde oturarak bir kapatma sistemi oluşturduğu konik bir yüzey tarafından oluşturulan hava geçirmez bir contaya olanak tanır. Bu yüzden Cryolock LN'e batırıldığında ucu LN'den izole edebilmektedir. Cryolock kapalı sistem olarak kullanıldığında hücrelerin LN ile doğrudan temas halinde olduğu tek zaman LN altındaki kapatma adımıdır (Malik ve ark., 2022).



**Şekil 2.14.** Cryolock (Anonim 2024b).

Cryoleaf, kolay kullanım için tasarlanmış bir vitrifikasyon ve depolama gerecidir. Maksimum soğutma hızına ulaşmak için sistem açıktır. Vitrikiye edilen hücreler, kapalı bir kapak sistemi ile mekanik strese ve kontaminasyona karşı korunduğu için depolama sırasındaki güvenlik artırılmıştır (Malik ve ark., 2022). Cryoleaf'in önerilen maksimum yükü, 2-3 oosit veya embriyodur. Cryoleaf'in koruyucu kılıfı LN banyosuna daldırılarak havanın dışarı çıkması sağlanır. Vitrikiye edilecek oositler veya embriyolar, uygun bir pipet kullanılarak hızlı bir şekilde Cryoleaf'e yüklenir (Şekil 2.15). Yükleme sonrası solüsyonun fazlalığı (1 µl'den az olması gerekli) pipet ile aspire edilerek uzaklaştırılır. Cryoleaf, LN içine yerleştirilir. Daha sonra koruyucu kılıf Cryoleaf üzerinden kaydırılarak Cryoleaf gereci kapatılır (Lopez ve ark., 2012; Malik ve ark., 2022).

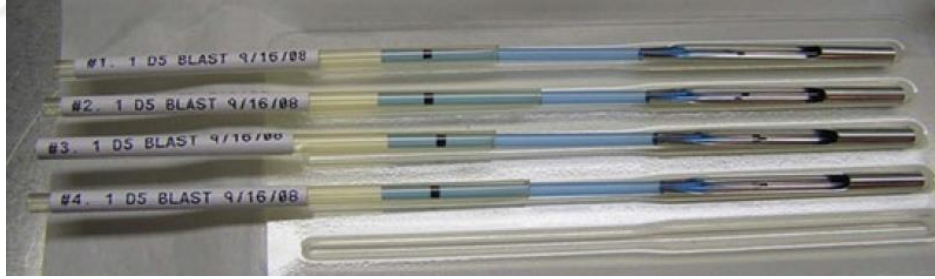


**Şekil 2.15.** Cryoleaf. (a) Cryoleaf'in ana kısmı ve ok, ince polietilen çubuktan yapılmış yükleme kısmını gösterir. Yeşil kısım yükleme çubuğunu korumak için aşağı kaydırılabilir. (b) Depolama için koruyucu kılıf. (a+b) Koruyucu kılıfı takılmış Cryoleaf (Anonim 2024c).

Cryotip, kalın bir parçaya (2000  $\mu\text{m}$  iç çap, 150  $\mu\text{m}$  duvar kalınlığı, 4,5 cm uzunluk) bağlanan ince bir parçaya (250  $\mu\text{m}$  iç çap, 20  $\mu\text{m}$  duvar kalınlığı ve 3 cm uzunluk) sahip plastik bir payetten oluşur. Bu gereç hareketli bir koruyucu metal manşon (Şekil 2.16) ile donatılmıştır (Kuwayama ve ark., 2005). Embriyolar, enjektör yardımıyla Cryotip'in dar kısmına, hava kabarcığı olmadan yaklaşık 1  $\mu\text{l}$  solüsyon içinde yüklenir (VerMilyea ve Brewer, 2017). Koruyucu kılıf dar kısmın üzerine çekilerek payetin her iki ucu ısıyla kapatılır (Şekil 2.17). Daha sonra gereç LN'ye daldırılır. Yükleme, kapatma, manşonun ayarlanması ve daldırılması için gereken süre 90 sn'yi geçmemelidir. Kapalı Cryotip sisteminin kullanımı, *in vitro* ve *in vivo* canlılık ve gelişim oranlarından ödün vermeden, kriyoprezervasyon ve depolama sırasında embriyo kontaminasyonu potansiyelini ortadan kaldırır (Kuwayama ve ark., 2005).



**Şekil 2.16.** Cryotip (VerMilyea ve Brewer, 2017).



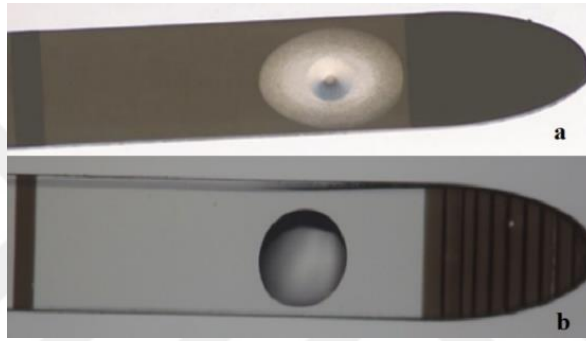
**Şekil 2.17.** Kapatılmış ve etiketlenmiş Cryotip (VerMilyea ve Brewer, 2017).

Kitasato Vitrifikasyon Sistemi yöntemin ortaya çıkmasının temeli 2006 yılında yapılan bir çalışmaya dayanmaktadır. Bu çalışma, emici bir membran filtresi üzerinde sığır embriyolarının başarılı şekilde vitrifiye edilebileceğini kanıtlamıştır (Momozawa ve Fukuda, 2006). Diğer vitrifikasyon gereçlerinden farkı ve yenilikçi özelliği vitrifikasyon solüsyonunu emici olmasıdır (Momozawa ve ark., 2017; Yoshida ve ark., 2022). Polietilen tereftalat filmin üzerine yerleştirilen gözenekli bir membrandan (1,5 mm genişlik ve 0,2 mm kalınlık) oluşur (Takahashi ve ark., 2020). Gözenekli membran sayesinde vitrifikasyon solüsyonu

emilir (Şekil 2.18). Yaklaşık 0,4 µl solüsyon içinde embriyo Kitasato Vitrifikasyon Sistemi'nin polietilen tereftalat filmin üzerine yerleştirilir (Momozawa ve ark., 2017; Momozawa ve ark., 2019). Fazla solüsyonun pipetleme yoluyla uzaklaştırıldığı Cryotop'un aksine, fazla solüsyon gözenekli membran tarafından kendiliğinden emilir. Cryotop'un çözümü mikroskopik görüntülemeye göre 30-50 nl (0,03 µl) iken, Kitasato Vitrifikasyon Sistemi'nde yalnızca 0,0013 µl olduğu bildirilmiştir (Takahashi ve ark., 2020). Kitasato Vitrifikasyon Sistemi'nin soğutma ve ısıtma oranları sırasıyla 683.000°C ve 612.000°C/dk'dır (Momozawa ve ark., 2019). Bu tekniğin gözenekli membran sayesinde vitrifikasyon solüsyonunu emme özelliğinin vitrifikasyon başarısına etkisini incelemek için polietilen tereftalat film üzerinde gözenekli membran olan ve olmayan (kontrol grubu vitrifikasyon gereci) vitrifikasyon gereçleri kıyaslanmıştır. Vitrikiye edilip çözödürülen fare blastosistlerinin hatching oranlarının Kitasato Vitrifikasyon Sistemi (%91,8) yönteminde kontrol grubuna (%77) göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber Kitasato Vitrifikasyon Sistemi ile vitrikiye edilen ve vitrikiye edilmeden transfer edilen 2 hücreli fare embriyolarında gebelik oranları (%100) benzer bulunmuştur (Momozawa ve ark., 2017). Bu gerecin teknolojisi fare deneylerinde geliştirildikten sonra Diamour® (Mitsubishi Paper Mills Ltd., Tokyo, Japonya) adıyla piyasaya sunulmuştur (Yoshida ve ark., 2022). İnsan blastosistleri Cryotop (%88,9) ve Kitasato Vitrifikasyon Sistemi (%100) ile vitrikiye edilip ısıtıldığında re-ekspanse oranları benzer bulunmuştur. Araştırmacılar Kitasato Vitrifikasyon Sistemi kullanımının deneyimsiz kişiler için bile vitrifikasyon işlemini çok kolaylaştırdığını ve vitrifikasyon başarısının yaygın kullanılan Cryotop ile karşılaştırılabilir olduğunu bildirmişlerdir (Takahashi ve ark., 2020). *In vitro* sığır embriyolarında vitrifikasyon solüsyonunu emen gözenekli membranı varken ve yokken (Şekil 2.19) vitrikiye edildiğinde gözenekli membrana sahip vitrifikasyon (%83,1) ve vitrikiye edilmeyen (%85,7) gruplardaki hatching oranları gözenekli membranı olmayan vitrifikasyon (%60,6) grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur (Momozawa ve ark., 2023).



**Şekil 2.18.** Kitasato vitrifikasyon sistemi. (a) Koruyucu payet kapağı. (b) Kitasato Vitrifikasyon Sistemi, akrilonitril bütadien stiren reçine tutucu ve bir destekten oluşur. Destek, bir polietilen tereftalat (PET) film ve PET filmin üzerine yerleştirilen, vitrifikasyon solüsyonunu emen gözenekli bir membrandan oluşur (Momozawa ve ark., 2023).



**Şekil 2.19.** Polietilen tereftalat film üzerine yerleştirilen bir vitrifikasyon solüsyonu emicisi olan gözenekli bir membranın olduğu (a) ve olmadığı (b) Kitasato Vitrifikasyon Sistemi'nin vitrifikasyon solüsyonunun (yaklaşık 0,6 µl) yüklendiği kısmın görünümü (Momozawa ve ark., 2023).

### 2.3. Farklı Vitrifikasyon Gereçleriyle Vitrikiye Edilen IVP Embriyolarının Canlılığı

Yavaş dondurma, IVD embriyolarının kriyoprezervasyonu için en yaygın kullanılan yöntem olmasına rağmen vitrifikasyon, IVP embriyolar için alternatif olarak ortaya çıkmıştır. IVD embriyolar hem yavaş dondurma hem de vitrifikasyon için benzer başarı sonuçları verirken, IVP embriyoları vitrifikasyon ile daha tatmin edici sonuçlar vermektedir (Do ve ark., 2016; Marsico ve ark., 2019; Mogas ve ark., 2024). Vitrifikasyon sonrasında IVP sığır embriyolarının canlılık ve hatching oranları araştırmalar arasında önemli farklılıklar göstermektedir (Tablo 2.3). Burada asıl önemli olan vitrikiye edilen embriyoların transferi sonrası gebelik oranı ile vitrikiye edilmeyen embriyoların gebelik oranlarının karşılaştırılmasıdır (Tablo 2.4).

**Tablo 2.3.** Vitrifikasyon sonrasında IVP sığır embriyolarının canlılık ve hatching oranları.

| Yöntem       | KP/saniye       | Hacim   | Gün | Re-eks.<br>(%)     | Hatching<br>(%)    | Kaynak                                    |
|--------------|-----------------|---------|-----|--------------------|--------------------|-------------------------------------------|
| OPS          | %33/20          | 5 µl    | 7   | 91,6 <sup>1a</sup> | 49,6 <sup>1A</sup> | Mezzalira ve ark., 2004                   |
| OPS          | %33/45          | 5 µl    | 7   | 82 <sup>1b</sup>   | 54 <sup>1A</sup>   |                                           |
| OPS          | %33/20          | 5 µl    | 8   | 65,8 <sup>2a</sup> | 51,7 <sup>2A</sup> |                                           |
| OPS          | %33/45          | 5 µl    | 8   | 68,7 <sup>2a</sup> | 33,2 <sup>2B</sup> |                                           |
| OPS          | 6,16 M/25       | 1-2µl   | 7,5 | 52,1               | 51,3               | Mucci ve ark., 2006                       |
| Cryoleaf     | %30/45-60       | -       | 7   | 100                | 61,7               | Huang ve ark. 2007                        |
| OPS          | %40/30          | -       | 7   | -                  | 27,5               | Rios ve ark., 2010                        |
| Cam kapillar | %40/30          | -       | 7   | -                  | 18,9               |                                           |
| Cam kapillar | %40/30          | 0,5µl   | 7   | -                  | 61,3               |                                           |
| Cam kapillar | %40/30          | 1µl     | 7   | -                  | 58,3               |                                           |
| CPS          | %40/25          | 1-2µl   | 7   | 56,3               | 34,9               | Yu ve ark., 2010                          |
| OPS          | %40/25          | 1-2µl   | 7   | 58                 | 35,2               |                                           |
| Emici kağıt  | 5,5 M/20        | 2-5µl   | 8   | 94,7               | 73                 | Kim ve ark., 2012                         |
| Fibreplug    | %33/20-25       | 0,3-3µl | 7-8 | 94,5               | 53,6               | Caamaño ve ark., 2015                     |
| Hook         | %40/45          | -       | 7-8 | 86,2               | 84,3               | Vargas Reyes ve Chacón<br>Jaramillo, 2016 |
| OPS          | 7M EG/30        | 1 µl    | 7   | 48,08 <sup>a</sup> | 11,54 <sup>A</sup> | Rhodes-Long, 2020                         |
| Cryotop      | 7M EG/30        | 1 µl    | 7   | 81,25 <sup>b</sup> | 31,25 <sup>B</sup> |                                           |
| Fork         | %32/30          | 0,5 µl  | 7   | 95                 | 74                 | Oliveira ve ark., 2020                    |
| Fibreplug    | %33/20-25       | -       | 7-8 | 96,6               | 79,8               | Gómez ve ark., 2020                       |
| VitTrans     | %30/60          | -       | 7   | 78,4 <sup>a</sup>  | 31,4 <sup>A</sup>  | Martínez-Rodero ve ark.,                  |
| VitTrans     | %30/60          | -       | 8   | 63 <sup>b</sup>    | 19,9 <sup>B</sup>  | 2021                                      |
| Cryolock     | Bo-Vitricool/30 | -       | 7   | 86                 | -                  | Najafzadeh ve ark., 2021                  |
| Klasik payet | 7M EG/30        | 10 µl   | 7   | -                  | 10,5               | Yıldız, 2022                              |
| Vitrific     | Vitrogen/40     | -       | 7-8 | 67,19              | 26,67              | Pioltine ve ark., 2023                    |
| KVS (-)      | %30/30          | 0,6 µl  | 6-7 | 87,9 <sup>a</sup>  | 60,6 <sup>A</sup>  | Momozawa ve ark., 2023                    |
| KVS (+)      | %30/30          | 0,6 µl  | 6-7 | 98,6 <sup>b</sup>  | 83,1 <sup>B</sup>  |                                           |
| Cryotop      | %30/<60         | -       | 7   | 81,36              | 30,46              | Martínez-Rodero ve ark.,<br>2024          |
| Cryolock     | Bo-Vitricool/30 | <0,2µl  | -   | 25,58              | 9,30               | Sarı, 2024                                |

Re-ekspansiyon: Re-eks., Kitasato vitrifikasyon sistemi emici membranı olan: KVS(+) ve olmayan: KVS(-). Aynı sütunda farklı harflerle gösterilenler istatistiksel olarak farklıdır.

**Tablo 2.4.** Vitrifiye edilen ve edilmeyen IVP sığır embriyolarının transfer sonrası gebelik oranları.

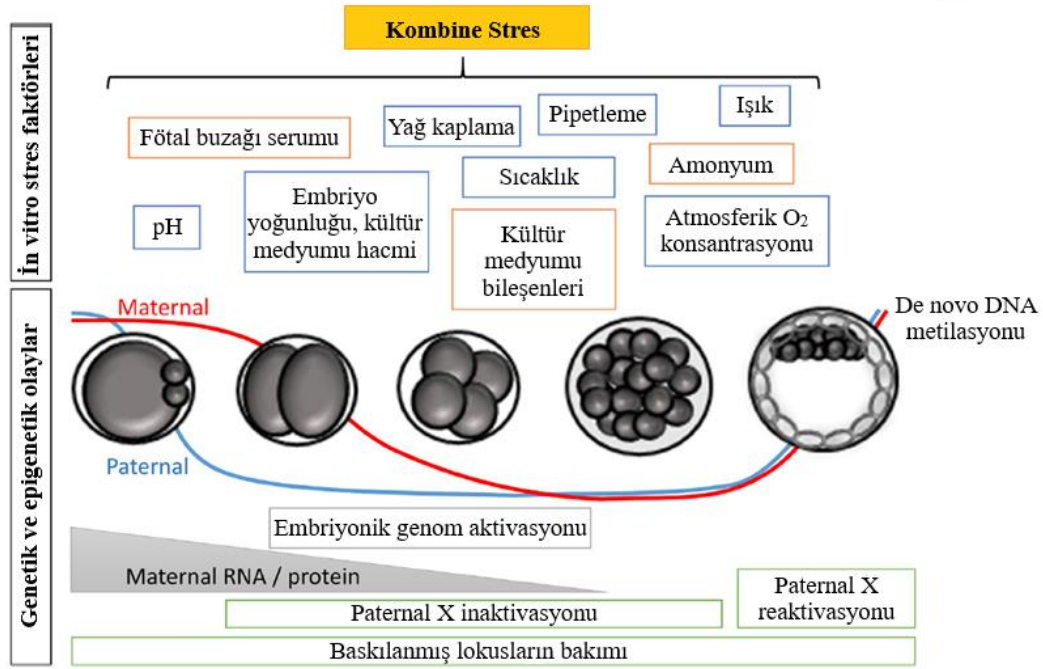
| Vitrifikasyon<br>Gereci | KP/saniye                                | Hacim  | ≥ 30. gün<br>gebelik (%) | ≥ 60. gün<br>gebelik (%) | Kaynak                    |
|-------------------------|------------------------------------------|--------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Klasik vitrifikasyon    | %50/30                                   | -      | 63                       | -                        | Agca ve ark., 1998        |
| Kontrol                 | -                                        | -      | 68                       | -                        |                           |
| Cryotech                | Cryotech<br>vitrifikasyon<br>kiti/ 60–90 | -      | 46,8                     | -                        | Gutnisky ve ark.,<br>2013 |
| Kontrol                 | -                                        | -      | 46,6                     | -                        |                           |
| Cryotop                 | %40/20                                   | -      | 35,89 <sup>a</sup>       | 31,19 <sup>A</sup>       | Sanches ve ark.,<br>2016  |
| Kontrol                 | -                                        | -      | 51,35 <sup>b</sup>       | 43,24 <sup>B</sup>       |                           |
| Cryotop                 | %30/60                                   | 0,1 µl | 40                       | 40                       | Do ve ark., 2018          |
| Kontrol                 | -                                        | -      | 41,3                     | 37,6                     |                           |
| Fork                    | %32/30                                   | 0,5 µl | -                        | 40                       | Oliveira ve ark.,<br>2020 |
| Kontrol                 | -                                        | -      | -                        | 43                       |                           |
| Fibreplug               | %33/20-25                                | -      | 62                       | 60                       | Gómez ve ark.,<br>2020    |
| Kontrol                 | -                                        | -      | 63                       | 57                       |                           |
| Fibreplug               | %33/25                                   | -      | 64                       | 62                       | Gómez ve ark.,<br>2022    |
| Kontrol                 | -                                        | -      | 68,7                     | 56,2                     |                           |
| Cryotop                 | %40/45                                   | 0,2 µl | 51,8                     | -                        | Park ve ark., 2024        |
| Kontrol                 | -                                        | -      | 50,6                     | -                        |                           |

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilenler istatistiksel olarak farklıdır. Kontrol, vitrifiye edilmeyen gruptur.

#### 2.4. IVP ve IVD Embriyoların Kriyoprezervasyonunu Etkileyen Farklılıklar

*İn vivo* fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim, bu mikro ortamın embriyogenezi destekleme, besinleri, büyüme faktörlerini, antioksidanları, üreme hormonlarını, proteazları ve gamet ve embriyoların diğer düzenleyici moleküllerini sağlama yeteneği nedeniyle ovidukt kanalında gerçekleşir. Ayrıca bu üreme organının hücresel yapısı embriyoların uterusu taşınmasına olanak sağlar (Li ve Winuthayanon, 2017). *İn vivo* ortamı taklit etmek çok zordur. Optimize edilmemiş *in vitro* kültür koşulları, hücresel metabolizma (D'Souza ve ark., 2018; Khurana ve Niemann, 2000), metabolik profil (de Souza ve ark., 2015), lipidlerin kalitesi ve miktarı (Sudano ve ark., 2016), gen ekspresyonları (Lonergan ve ark., 2006) ve epigenetik belirteçler (Ramos-Ibeas ve ark., 2019) üzerinde önemli etkiye sahip

olduğundan embriyonun gelişim yeteneğini etkiler (Şekil 2.20.). Bu yüzden *in vitro* koşulların *in vivo* koşulları taklit etmesi çok önemlidir (Marsico ve ark., 2019). Araştırmacılar, oosit kalitesinin blastosist verimini etkileyen ana faktör olduğunu ve embriyo kültürü koşullarının blastosist kalitesinde önemli bir rol oynadığını belirtmektedir (Lonergan ve ark., 2003; Rizos ve ark., 2002).



**Şekil 2.20.** Preimplantasyon embriyo gelişimi sırasında meydana gelen hassas genetik ve epigenetik olayların *in vitro* embriyo üzerinde etkili olan temel kimyasal (turuncu) ve fiziksel (mavi) stres faktörlerinin özeti (Ramos-Ibeas ve ark., 2019).

Embriyo ilk önce anne genomundan üretilen mRNA'yı kullanır. Bu mRNA'lar tükenmeye başlayınca embriyonik genom aktivasyonundan üretilen mRNA'lar kullanılır. Embriyonik genom aktivasyonu sıgırlarda 8 hücreli embriyo aşamasının sonlarında meydana gelmektedir. Erken gelişim sırasında canlılık için en kritik olay olduğu kabul edilen embriyonik genom aktivasyonu; erken farklılaşma olayları, başarılı embriyo implantasyonu ve fetal gelişim ile ilişkilidir. Embriyonik genom aktivasyonundan önce veya sonra (4 hücreli veya 16 hücreli embriyolarda) kültür koşullarının *in vivo*dan *in vitro*ya veya tam tersi şekilde değiştirilmesinin gelişim oranları üzerinde bir etkisinin olmadığı fakat o dönemdeki *in vitro* koşulların üretilen blastosistlerin transkriptomunu kritik derecede etkilediği bildirilmiştir (Gad ve ark., 2012).

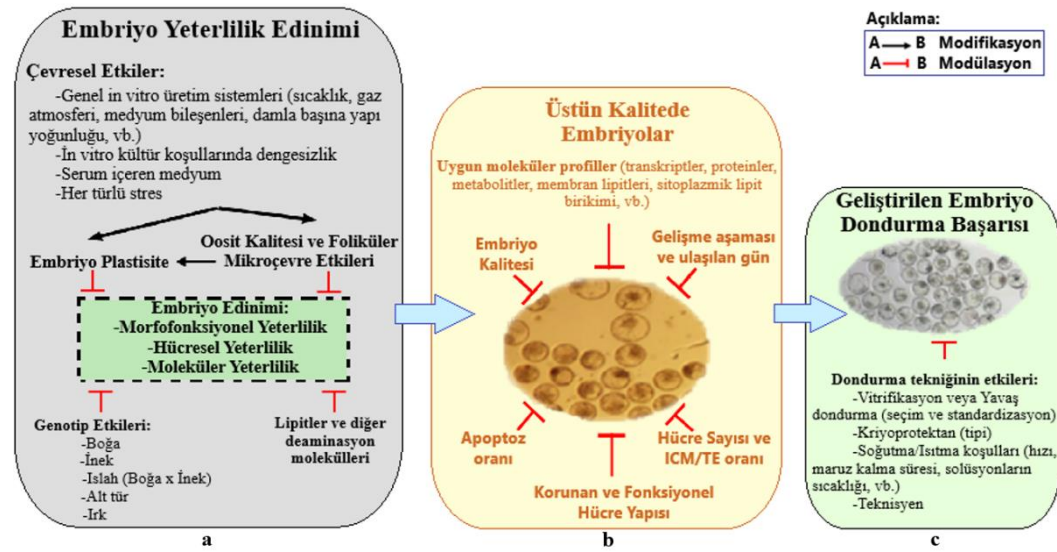
Sığır IVP embriyolarda IVD embriyolara kıyasla morfolojik kalitede belirgin bir bozulma ve kriyoprezervasyon sonrası düşük canlılık bildirilmiştir (Mahmoudzadeh ve ark., 1994; Ohboshi ve ark., 1997; Reinders ve ark., 1995). IVP embriyolarının kriyo hayatta kalma oranının azalması artan lipid içeriği, azalan trofoblastik hücreler arası bağlantılar, daha az gelişmiş iç hücre kütlesi, daha az mitokondri ve mikrovillus, mitokondrilerin yarısının şişmiş olması, daha geniş perivitellin boşluk, ölü hücre kalıntısının fazla olması, hatching sırasında matris ve sağlam kristanın olmaması gibi ultrastrüktürel (Fair ve ark., 2001) ve biyokimyasal özellikler ile ilişkilidir (Abe ve ark., 2002; Massip, 2001; Plante ve King, 1994; Rizos ve ark., 2002). Bu nedenle, IVP embriyolarının kriyotoleransını arttırmak amacıyla oksidatif stresi en aza indirmek için düşük oksijen atmosfer sistemi altında kültür, kültür solüsyonuna antioksidanların (Salzano ve ark., 2014; Sanches ve ark., 2013) ve endoplazmik retikulum stres inhibitörünün (Khatun ve ark., 2019) eklenmesi, vitrifikasyon solüsyonunda apoptoz inhibitörlerinin (Pero ve ark., 2018) ve antioksidanların (Truong ve Gardner, 2020) kullanımı gibi bazı stratejiler kullanılabilir.

Gelişim sırasında IVP embriyolarının, özellikle de serum destekli solüsyonda kültürlen embriyoların aşırı lipid damlacıklarının birikmesi, genellikle düşük kriyohayatta kalma ve düşük gebelik oranıyla ilişkilidir (Rizos ve ark., 2008; Sudano ve ark., 2011). *In vitro* kültürlen embriyolardaki bu artan lipid içeriğinin kesin mekanizması bilinmemektedir. Serum lipidleri embriyonik hücreler tarafından emilerek (Sata ve ark., 1999), mitokondriyal  $\beta$ -oksidasyon fonksiyonunu değiştirmekte (Abe ve ark., 2002) ve doymuş yağ asitleri ile kolesterolün hücre membranına dahil edilmesini teşvik ettiği düşünülmektedir. Bu durum IVP embriyolarını daha az geçirgen hale getirmektedir (Barceló-Fimbres ve Seidel Jr, 2007). Kültür ortamındaki serumun mitokondri sayısını azalttığı, hatching sırasında matris ve sağlam kristanın olmaması gibi metabolizma üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (Plante ve King, 1994). Vitrifikasyon sonrası canlılık oranları, *in vivo* blastosistlerde IVC'e alınan blastosistlere göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Rizos ve ark., 2002). Bununla birlikte oosit lipid miktarının 8 mm'den büyük foliküllerde daha fazla olduğu ve bu oositlerden üretilen

blastosistlerin lipit birikiminin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca 8. gün blastositlerin 7. gün blastosistlere göre daha fazla lipit içerdiği gözlenilmiştir (Annes ve ark., 2018). Bununla birlikte artan lipit miktarı embriyo kriyotoleransını olumsuz yönde etkilemektedir (Abe ve ark., 2002). Tüm bu faktörler birlikte IVP embriyolarının kriyoprezervasyona karşı daha fazla duyarlılığını da açıklayabilir (Marsico ve ark., 2019).

Zona pellusida, zigot ile blastosist aşaması arasındaki memeli embriyosunu çevreleyen ve oosit büyüme aşamasında üretilen bir glikoprotein tabakasıdır. Memelilerde zona pellusida kalınlığı ortalama 10 µm'dir. Oositlerdeki kalınlık, gözenek sayısı ve çapı gibi üstyapı özellikleri gelişim yeteneği (Báez ve ark., 2019; Santos ve ark., 2008) ve hatching yeteneği (Hoelker ve ark., 2006) ile ilişkilendirilebilir. Zona pellusida kalınlığının embriyo gelişimini daha da azalttığı (Van Soom ve ark., 2003) ve hatching sırasında zona pellusida ortalama çapının IVD blastosistlerde IVP'ye göre önemli ölçüde daha küçük olduğu bilinmektedir (Holm ve ark., 2002).

Embriyo gelişim yeterliliği ve kalitesi, kriyo hayatta kalma ve gebelik başarısı için çok önemlidir (Şekil 2.21). Genotip, oosit kalitesi ve foliküler mikro ortamı, *in vitro* üretim koşulları, lipitler ve diğer belirleyici moleküller gibi pek çok değişken embriyo yeterliliğini ve kriyo-hayatta kalmayı bozabilir (Marsico ve ark., 2019). *In vitro* veya *in vivo* olarak geliştirilen sığır embriyolarını karşılaştıran transkriptomik çalışmalar, gen ekspresyonunda (Driver ve ark., 2012; Gad ve ark., 2012), metilasyon modellerinde (Salilew-Wondim ve ark., 2018) ve proteinlerin tanımlanmasında (Banliat ve ark., 2022) farklılıklar olduğunu bildirmiştir. Tüm bu farklılıklar *in vivo* olarak geliştirilen embriyoların daha yüksek gelişim yeteneğinin altında yatan moleküler mekanizmaları kısmen de olsa açıklamaktadır (Banliat ve ark., 2022).

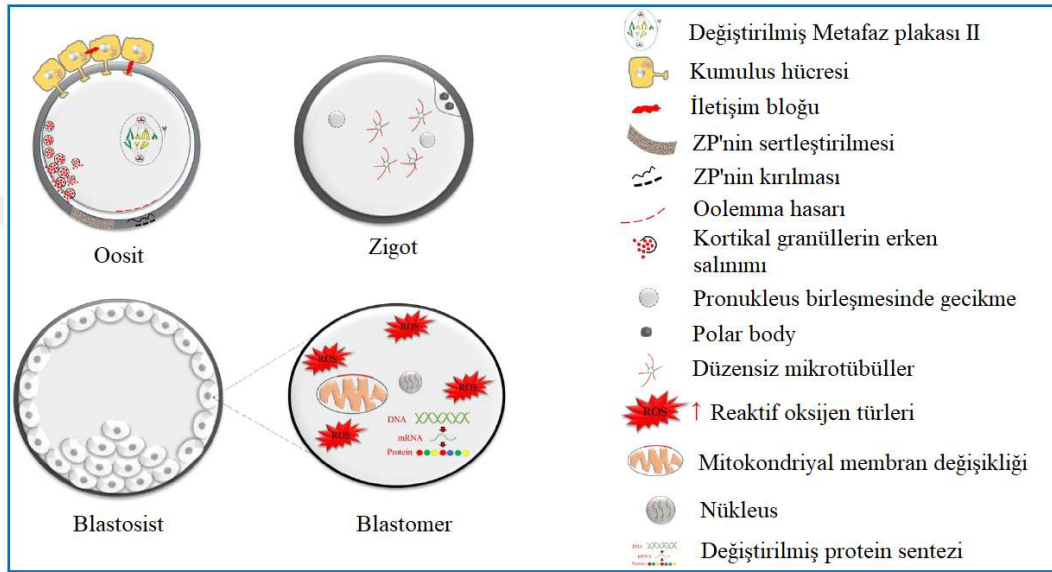


**Şekil 2.21.** Embriyonik gelişimsel yeterlilik edinimi için gerekli hücrel ve moleküler olaylar ve bunun kriyo-hayatta kalma üzerindeki etkisi. *In vitro* embriyo üretimi için birbirine bağlı adımlar (soldan sağa mavi oklar) üstün kalitede bir embriyo üretilmesini ve embriyonun kriyo-hayatta kalma başarısını artırabilir. (a) Embriyo yeterliliğinin kazanılması üzerine genel olarak çevresel ve genetik etkiler. (b) Üstün embriyo kalitesinin *in vitro* embriyo üretimi ile ilişkili belirleyici değişkenler (mükemmel kalitede taze IVP blastosistler). (c) Kriyoprezervasyon ve kriyoprezervasyon tekniğinin etkileri sonrasında gelişimin başarılı bir şekilde yeniden başlatılması (çözdürme sonrası IVP blastosistlerinin re-ekspansiyonu). Tüm olaylar (a, b ve c) embriyonun dondurularak hayatta kalmasını etkiler (Marsico ve ark., 2019).

## 2.5. Kriyoprezervasyon Aşamalarında Karşılaşılan Hücrel Hasarlar

Hücrel hasarın iki ana nedeni, buz kristallerinin oluşumuyla meydana gelen fiziksel hasar ve hücre içi solüsyon konsantrasyonlarındaki değişikliklerden ortaya çıkan kimyasal hasardır (Mandawala ve ark., 2016). Embriyolar, kriyoprezervasyonu takiben kriyohasar olarak bilinen farklı hasar türlerine duyarlıdır. Dondurulmuş embriyoların uğradığı kriyohasarlara derecesi birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler; fizyolojik kalite, soğutma hassasiyeti, plazma membran geçirgenliği, ozmotik stres toleransı, gelişim aşaması, embriyo türü, kriyoprezervasyonda kullanılan kriyoprotektan (KP) tipi ve dondurma tekniğidir (Moussa ve ark., 2014; Vajta ve Kuwayama, 2006). Kriyoprezervasyon işlemi immatür veya matür oositlerin ve blastosistlerin çeşitli organellerine zarar verir (Şekil 2.22). Bu yüzden oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi sürecinde yer alan çeşitli morfolojik olaylar olumsuz etkilenebilir. Oositlerde, kumulus hücrelerinin

iletişiminde kesinti, oolemmada hasar, zona pellusidanın yırtılması ve sertleşmesi, metafaz II plak oluşumunda değişiklik, kortikal granüllerin erken salınımı ve toplanması görülmektedir. Embriyolarda mikrotübüllerin düzensizliği, zigot oluşumu sırasında pronükleusun toplanmasının gecikmesi, protein sentezinde değişiklik ve reaktif oksijen türlerinde artış olduğu bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2022).



**Şekil 2.22.** Kriyoprezervasyon işlemi sırasında oositlerin, zigotların ve blastomerlerin kriyoyaralanmasını gösteren şematik resim.↑: Arttı, ZP: Zona pellusida (Kumar ve ark., 2022).

Soğuk hasarları, +15°C ve -5°C arasındaki soğutma işlemi sırasında hücre içi lipit damlacıkların, lipit içeren membranların ve sitoskeletonun (hücre iskeleti) üzerinde meydana gelen geri dönüşü olmayan değişiklikleri ifade etmektedir (Vajta, 2000). Bu tür hasarlar, genellikle yavaş dondurma tekniği ile ilişkilidir. Vitrifikasyon yönteminde ise, soğutmanın çok hızlı olması ve embriyoların tehlikeli sıcaklık bölgesine çok kısa bir süre maruz kalmasından dolayı dondurulan embriyoların hasarlanma riski önemli ölçüde azalmaktadır (Rall, 1987).

Kriyoprezervasyon sırasında buz kristallerinin oluşumu, kriyohasar için başlıca kaynaklarından biridir. Yavaş dondurma yöntemi, -5°C ile -80°C arasındaki sıcaklıklarda sitoplazma ve nükleus dahil olmak üzere hücrelerin içinde ve hücreleri çevreleyen sıvı bölgede buz kristali oluşumuna neden olmaktadır. Hücre içi buz

kristali, sitoskeletona ve hücre organellerine zarar vererek hücre gelişimine zarar verebilir veya öldürücü bir etkiye sahip olabilir. Buna karşılık, yüksek KP konsantrasyonu ve hızlı soğuma oranı sağlayan vitrifikasyon yöntemi, hücre içi ve hücre dışı suyun buz kristallerine dönüşümünü atlayarak cam benzeri bir duruma katılaşmasını sağlamaktadır (Dhali ve ark., 2019; Ozkavukcu ve Erdemli, 2002).

Embriyoların zona pellusida ve blastomerlerinde kırık hasarları yaygın olarak kriyoprezervasyonun ardından gözlenmektedir. Bu tür hasarlar, genellikle -50°C ve -150°C arasındaki sıcaklık bölgesinde katılaşmış solüsyonun mekanik etkisi nedeniyle dondurma sırasında (Rall ve Meyer, 1989) veya çözündürme sırasında oluşmaktadır. Yavaş dondurma ve klasik vitrifikasyon yönteminde payet, havada bekletilmeden direkt su içinde çözündürüldüğünde zona pellusida kırılma insidansı artırmıştır. Bundan dolayı payetin havada 5-10 sn bekletme sonrası suda çözündürülmesi gerektiği bildirilmiştir (Cetin ve Bastan, 2006; Hasler, 2002; Jones, 2021).

Kriyoprezervasyonun ön aşamasında, hücreler yüksek konsantrasyondaki kriyoprotektan solüsyonuna maruz kaldığında, hücre içi ve hücre dışı solüsyonları arasında ozmotik basınç farkı oluşur ve hücre içindeki su dışarı doğru hareket ederek hücrenin büzülmesine neden olur. Benzer şekilde, çözündürme ve kriyoprotektanı uzaklaştırma aşamasında, su moleküllerinin hareketi, hücre dışından içeriye doğru hareket ederek hücrenin şişmesine neden olur. Bu durum ozmotik stres olarak bilinir ve hücrelerin gelişimine zarar verir. Dondurulan hücreler, dondurulmayanlara kıyasla suya kriyoprotektanlardan daha fazla geçirgendir (Pedro ve ark., 1997). Bu nedenle, kriyoprezerve edilen hücreler, kriyoprezerve edilmeyen hücrelere kıyasla ozmotik strese daha duyarlıdır. Vitrifikasyon yöntemi, yavaş dondurma yöntemine göre daha yüksek kriyoprotektan konsantrasyonu kullandığı için daha fazla ozmotik stres oluşturmaktadır. Vitrifikasyon sırasında ozmotik stresi ve kriyoprotektana bağlı hücre toksisitesini azaltmak için pratik bir yaklaşım, soğutma hızını artırmak ve aynı zamanda kriyoprotektan konsantrasyonunu azaltmaktır (Dhali ve ark., 2019).

Memeli embriyolarında en fazla bulunan mitokondri organeli, hücrede enerji üreten tek kaynaktır. Mitokondriyal disfonksiyonu veya anormallikleri, embriyoların gelişimi için kritik öneme sahiptir. Embriyoların gelişimindeki başarısızlık, mitokondri tarafından ATP üretiminin azalması ile ilişkilidir (Brevini ve ark., 2005). Kriyoprezervasyon, mitokondriyal disfonksiyonuna, mitokondriyal şişmeye, anormal şekilli mitokondriye, mitokondriyal membranların yırtılmasına neden olabilir ve dondurma-çözdürme sonrasında zayıf embriyo gelişimine katkıda bulunabilecek hücre ATP içeriğini azaltmaktadır (Dhali ve ark., 2019).

Kriyoprezervasyonun oksidatif stres, apoptoz, hücre gelişim süreci ve sperm-oosit etkileşimi ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerinde olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir (Moussa ve ark., 2014). Gen ekspresyonundaki bu tür değişiklikler, kriyoprezerve edilen oosit ve embriyoların gelişim yeteneğini zayıflatan faktörlerden biridir (Dhali ve ark., 2019). Yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri ile kriyoprezerve edilen embriyoların DNA bütünlüğünün etkilendiği bildirilmiştir (Kader ve ark., 2009).

## **2.6. Vitrifikasyon Yönteminin Kullanımını Sınırlayan veya Engelleyen Faktörler**

Vitrifikasyon yönteminin sahada yavaş dondurma yöntemi gibi yer alabilmesi için hala bazı sınırlamalar mevcuttur. Bu sınırlamalar; 0,25 ml’lik payette DT’ye uygun başarılı bir vitrifikasyon tekniğinin geliştirilememesi, yüksek konsantrasyonda KP kullanımı, çözdürme işleminde laboratuvar ve deneyimli kişi gerektirmesidir (Sanches ve ark., 2017). Vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezerve edilen embriyolar çözdürülürken aşamalı olarak, azalan yoğunluktaki solüsyonlara maruz kalma işlemlerinden geçmektedir. Bu problemin üstesinden gelmek için 0,25 ml’lik payet içinde işlemsiz çözdürme yapılması düşünülmüştür. Payetlerde yapılan klasik vitrifikasyon işleminde payete çözdürme solüsyonları da konulmuş fakat istenilen başarı elde edilmemiştir. Araştırmacılar, payet içinde embriyo ile çözdürme solüsyonlarının yeterince karışmadığını ifade etmişlerdir (Satılmış ve ark., 2014). Bununla birlikte KP’lar yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında hücrelere zarar verebilir (Jang ve ark., 2017). Vitrifikasyon yönteminde vitrifiye

edilen hacim ve vitrifikasyon solüsyonlarında kullanılan KP azaltılarak vitrifikasyonun başarı olasılığı artırılmıştır (Yavin ve Arav, 2007). Bu yüzden son zamanlarda minimum hacimlerde yapılan ultra vitrifikasyon yöntemi tercih edilmektedir (Momozawa ve ark., 2023). Bununla birlikte laboratuvar ortamı ve deneyimli kişi gerekmeden (saha da uygulanabilirliği kolaylaştırmak amacıyla) vitrifikasyon gerecinde vitrifiye edilen embriyonun 0,25 ml'lik payetlerde tek adımda ısıtılarak alıcı hayvana direkt transfer edilmesine imkân veren çözündürme protokolleri geliştirilmiştir (Oliveira ve ark., 2020; Tajimi ve ark., 2018). Bu çözündürme protokollerinin en önemli avantajı, vitrifikasyonun saha da kullanımını arttırabilmesi, özellikle IVP embriyolarında gebelik başarısını arttırabilmesi ve embriyonun çözündürülmesi sonrası alıcı hayvana transfer etme süresinde rahatlık (>15 dk) sağlamasıdır (Gordon, 2003; Mogas ve ark., 2024). Direkt transfere uygun yavaş dondurulan embriyolar çözündürme sonrasında mümkün olduğu kadar kısa bir sürede (<3 dk) transfer edilmesi istenmektedir (Güler ve ark., 2021). Vitrifikasyonu direkt transfere uyarlayan payet içi çözündürme protokolünün dezavantajı ise yavaş dondurma yönteminin çözündürülmesine göre kısmen daha karmaşık adımları içermesidir. Tüm bu bilgiler ve IVP embriyoların dünyadaki artan üretimi göz önüne alındığında; IVP sığır embriyolarının ucuz ve direkt transfere uygun olacak şekilde başarılı bir vitrifikasyon gereci ve prosedürüne ihtiyaç duyulduğu öne çıkmaktadır (Mogas ve ark., 2024).

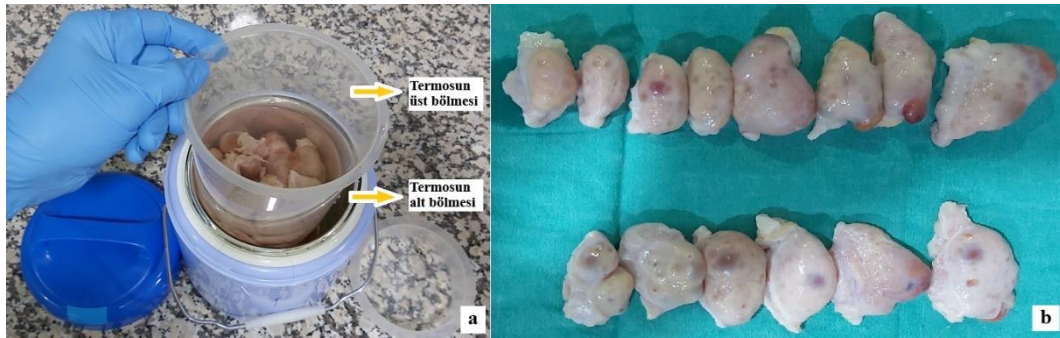
Sunulan bilgiler ışığında bu araştırmada, vitrifiye edilecek hacmi 0,2 µl'nin altına düşüren ve vitrifikasyon solüsyonlarındaki KP yoğunluğunu azaltmayı hedefleyen "modifiye payet" adı verilen yeni bir vitrifikasyon gerecinin başarısını ortaya koymak amaçlandı. Bu amaçla modifiye payet (MP) yöntemi yaygın olarak kullanılan OPS tekniği ile karşılaştırılmıştır. Bu gerecin sahada uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, 0,2 M süktroz içeren çözündürme medyumunu kullanılarak 0,25 ml'lik payetlerde tek adımda çözündürme işlemi uygulanmıştır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Doktora tez çalışması 17.11.2021 tarih ve 827 sayılı karar ile Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak yapıldı.

#### 3.1. Ovaryumların Toplanması ve Laboratuvara Getirilmesi

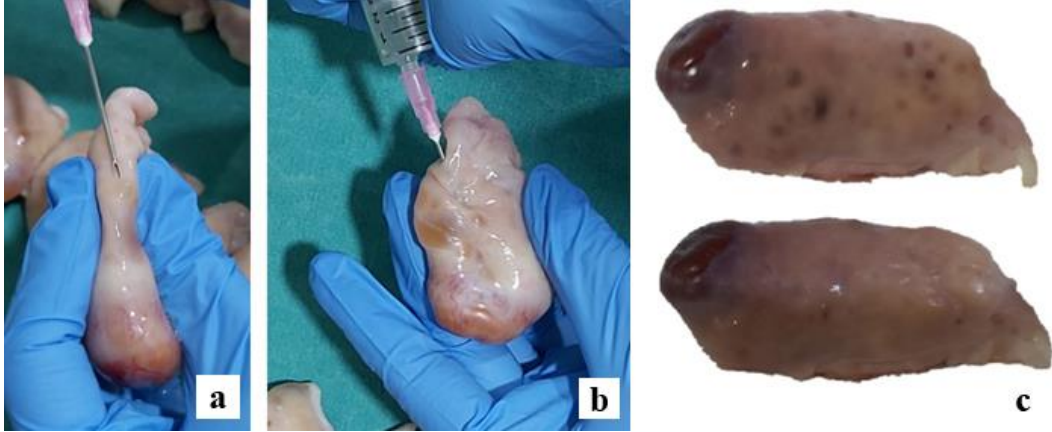
Ovaryumlar Burdur ilinde bulunan 2 farklı mezbahada kesilen sığırlardan temin edildi. Ovaryumları taşıma medyumunu, çalışma gününden 1 gün önce 1 lt'lik %0,9 izotonik sodyum klorür içerisine 1 ml (%0,1) gentamisin eklenerek hazırlandı. Ovaryumlar, kesimin başladığı saat dikkate alınarak 2-3 saat içerisinde mezbahadan laboratuvara taşıma medyumunu içeren termos içerisinde getirildi. Termos olarak çift bölmeli termos kullanıldı. Kesim başladığında termosun alt bölümüne sıcak su eklenirken üst bölümüne taşıma medyumunu konuldu (Şekil 3.1). Taşıma medyumunu 25-30°C sıcaklığında olacak şekilde ayarlandı. Kesilen ineklerin ovaryumları, bıçak ile üreme organlarından ayrıldı ve taşıma medyumunu ile yıkılarak termos içerisine bırakıldı. Yeterli sayıda ovaryum alındığında (maksimum 1,5 saat içerisinde) Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Genetik ve Embriyo Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ait laboratuvara getirildi. Ovaryumlar taşıma medyumunu ile yıkandıktan sonra steril serviyet ile kurutularak yeni bir serviyet üzerine yerleştirildi (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Ovaryumlar için kullanılan termos (a) ve serviyet üzerine yerleştirilen ovaryumlar (b).

### 3.2. Oositlerin Folikül Aspirasyonu ile Elde Edilmesi ve Seçilmesi

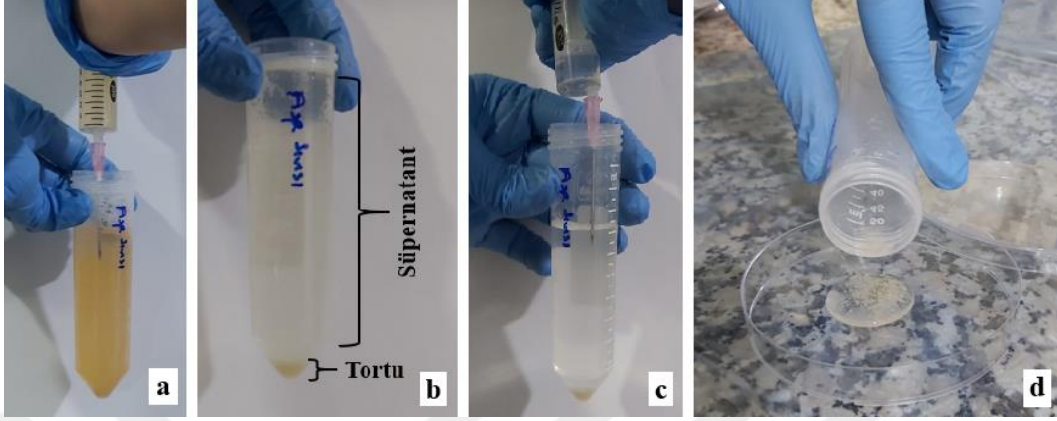
Foliküllerin aspirasyonu işleminde aspirasyon medyumunu olarak %1 Fetal Sığır Serum (FBS, Sigma F7524) içeren laktatlı ringer solüsyonu kullanıldı. Aspirasyon medyumunu çalışmadan 1 gün önce hazırlanarak ısınması için 38,5°C'deki etüv (Mikrotest, MST-55) içerisine bırakıldı. Aspirasyon işleminin prosedürü Güler (2018)'in bildirdiğinin modifikasyonu ile yapıldı. İmmatür oositler, 18 Gauge'luk enjektör iğnesi bulunan 10 ml'lik enjektör yardımıyla yaklaşık 2-8 mm çaplarında olan foliküllerin aspirasyonu ile elde edildi. Enjektör içinde biriken 3-5 ovaryumun folikül sıvısı 50 ml'lik konik uçlu tüp içine yavaş bir şekilde bırakıldı. Aspirasyon işlemi yapılırken iğnenin açık ucu yukarı bakacak şekilde tutuldu (Şekil 3.2). İğne ile ovaryumun korteksinden girildi ve iğneyi ovaryumdan çıkartmadan mümkün olabildiğince çok sayıda folikül aspire edildi (Şekil 3.2). Enjektöre aspire edilen folikül sıvısı yavaş bir şekilde 50 ml'lik konik uçlu tüpün içine boşaltıldı. Aspirasyon işlemi bittikten sonra enjektörün içi en az 3 kez aspirasyon medyumuyla yıkanarak tüp içine boşaltıldı.



**Şekil 3.2.** Aspirasyon işleminde iğne ucunun yukarıya bakması (a), foliküllerin aspirasyonu (b), üstte folikülleri bulunan altta folikülleri aspire edilen ovaryum görüntüsü (c).

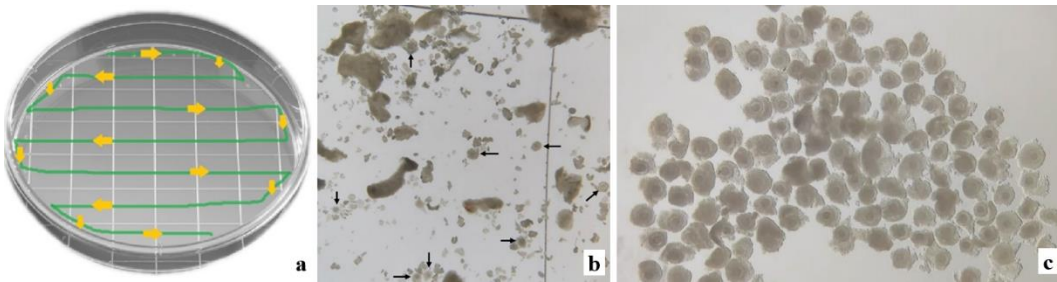
Aspirasyon işlemi bittikten sonra, 50 ml'lik konik uçlu tüp içinde biriken oositlerin yıkama işlemi, oositlerin dibe çökmesinde 5 dk bekletilmesi dışında Güler (2018)'in bildirdiği gibi yapıldı. Yıkanan oositler 100x20 mm'lik petri

içerisine boşaltıldı (Şekil 3.3). Mikroskoptaki görüntülemelerinin tümü, mikroskoba entegre olan kamera (Leica, IC90-E) yardımıyla yapıldı.



**Şekil 3.3.** Oositlerin yıkanarak petriye aktarılması. Aspirasyon işlemi bittikten 5 dk sonra tüpteki folikül sıvısının uzaklaştırılması (a), 2. yıkamada 5 dk bekleme sonrası tüpün dipinde oluşan tortu (b), yıkama sonunda berrak aspirasyon medyumunu görünümü (c) ve tüpteki oositlerin petri kabına aktarılması (d).

Oositler, altı 1 cm aralıkla çizilmiş 100x20 mm'lik petriye aktarıldıktan sonra stereo mikroskop (Leica, M125-C) altında tarandı. Tarama işlemi, tüm karelere bakılacak şekilde gerçekleştirildi (Şekil 3.4). Bulunan oositler, aspirasyon medyumunu içeren 60 ml'lik petri içerisine aktarıldı (Şekil 3.4). İmmatür oositler kalitelerine (A, B, C ve D kalite) göre değerlendirildi. A kalitede olan immatür oositler, 12 damla aspirasyon medyumunda yıkanarak çalışmaya alındı.



**Şekil 3.4.** Tarama yönü (a), petrinin görüntüsü (b) ve oositler (c).

**A Kalite:** Homojen ooplazmaya sahip ve zona pellusida etrafında birbirine sıkı bir şekilde bağlı en az 3 kat kumulus hücrelere sahip immatür oositler çok kaliteli kabul edildi.

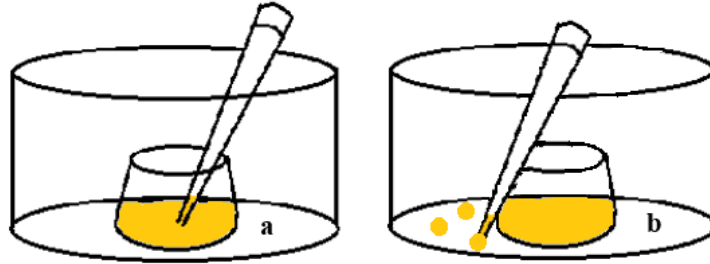
**B Kalite:** Ooplazma homojen, kumulus hücreleri arasında bağlantının daha zayıf ve A kalitesinden daha az kumulus hücre katmanına sahiptir. Zona pellusidanın 1/3 veya daha fazlası kumulus hücrelerine sahip oositlerde orta kaliteli kabul edildi.

**C Kalite:** Oositler kumulus hücrelerinden soyulmuş veya çok az kumulus hücresi ile çevrelenmiştir. Ooplazması heterojen görünümündeki bu oositler düşük kaliteli veya kalitesiz immatür oositlerdir.

**D Kalite:** Ağsı yapıda genişlemiş kumulus hücrelerine sahip kararmış şekilde görünen immatür oositler kalitelisiz veya dejenere olmuş oositlerdir (Gordon, 2003).

### 3.3. *In Vitro* Maturasyon

Çalışmadan 1 gün önce yaklaşık 700 µl maturasyon medyumunu (BO-IVM, IVF Bioscience 71001) 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne (maturasyon petrisi ve oositlerin yıkanması için) katılarak 38,5°C, %6 CO<sub>2</sub> ve yüksek nemli atmosferik ortamdaki inkübatöre konuldu. Ortası kuyucuklu petrinin orta kısmına 500 µl maturasyon medyumunu (40-45 oosit için) zemine yayılacak şekilde katıldı (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5.** Maturasyon medyumunun (500 µl) petrinin kuyucuklu kısmına yayılarak hazırlanması (a), maturasyon yıkama droplarının oluşturulması (b).

Kaliteli immatür oositler, en az 3 damla maturasyon medyumuyla yıkanarak maturasyon medyumuna içine yüklendi. Maturasyon petrisi 38,5°C, %6 CO<sub>2</sub> ve yüksek nemli atmosferik ortamdaki inkübatör (pHcbi, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> incubatör MCO-170M-PE) içine yerleştirildi. Maturasyon süreci 21-22 saat sonra tamamlandı.

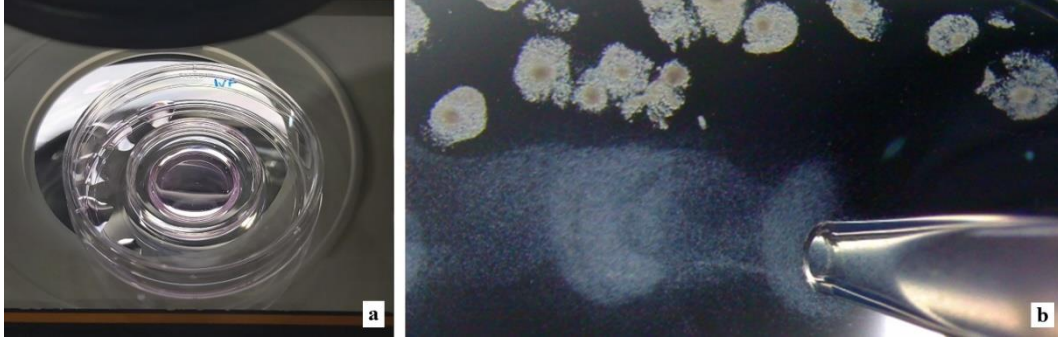
### 3.3.1. Maturasyon Değerlendirilmesi

Kumulus ekspansiyonu maturasyon kriteri kabul edildi. Maturasyon değerlendirilmesi Kobayashi ve ark.'nın (1994) bildirdiği gibi 3 derecede yapıldı. 0. derece; immatür oosite kıyasla morfolojik değişiklik göstermeyen oositler, 1. derece; kumulus hücrelerinde genişleme olmuş fakat bazı kısımlarındaki bağlar sıkı durumda olan oositler, 2. derece; kumulus hücreleri çok genişlemiş, hücreler arası bağlar gevşemiş ve homojen görünen oositler olarak kabul edildi (Kobayashi ve ark., 1994). Fertilizasyona kumulus ekspansiyonu 1. ve 2. derecede olan oositler alındı.

### 3.4. *In Vitro* Fertilizasyon

Embriyoların fertilizasyon işleminde solüsyon olarak ticari BO-IVF medyumunu (IVF Bioscience, 71004) kullanıldı. Fertilizasyon işlemi IVF Bioscience protokolüne göre yapıldı (Anonim, 2022). Fertilizasyon günü 40-45 oosit için 500 µl fertilizasyon medyumunu petrisi ve yıkama için 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne yaklaşık 200 µl fertilizasyon medyumunu konuldu. Hazırlanan fertilizasyon petrisi ve yıkama solüsyonu 38,5°C, %6 CO<sub>2</sub> ve yüksek nemli atmosferik ortamdaki inkübatörde en az 2 saat gazlandı.

Maturasyonun 21-22. saatleri arasında oositler, en az 3 damla fertilizasyon medyumuyla yıkanarak fertilizasyona yüklendi. Daha önce formüle göre hesaplanan fertilizasyona yüklenmesi gereken sperma hacmi (µl) kadar sperma, fertilizasyon medyumuna eklendi (Şekil 3.6). Fertilizasyon petrisi; 38,5 °C, %6 CO<sub>2</sub> ve yüksek nem içeren inkübatörde 24 saat bekletilerek fertilizasyon işlemi tamamlandı.



**Şekil 3.6.** Fertilizasyon petrisi (a), fertilizasyon medyumuna spermanın eklenmesi esnasında alınan görüntü (b).

#### 3.4.1. Spermanın Hazırlanması

Spermadan kaynaklı etkiyi ortadan kaldırmak için fertilitesi bilinen bir boğanın sperması kullanıldı. Sperma, IVF Bioscience protokolüne (Anonim, 2022) göre yıkama tekniği ve BO-Semenprep solüsyonu (IVF Bioscience 71003) kullanılarak hazırlandı. BO-Semenprep solüsyonu 5 ml'lik enjektöre 4 ml çekildi ve 2'şer ml olacak şekilde 2 adet 15 ml'lik konik uçlu tüp içerisine aktarıldı. Sperma çözdürülmeden önce tüplerin kapağı sıkıca kapatılarak 30 dk inkübatörde (Mikrotest, MST-55) ısıtıldı. Sperma payeti LN tankından çıkarılıp 37°C'deki suda 30 sn boyunca çözdürüldü. Payet çözdürüldükten sonra steril gazlı bezle kurutuldu. Payetin kapalı ucu kesildi. Payetin açık ucu 2 ml BO-Semenprep solüsyonu içeren 15 ml'lik konik uçlu tüp içine yerleştirildi. Payetin içeriği, payetin pamuk tıkacının altından makas ile kesilerek aktarıldı. Spermayı içeren konik tüp, 328 x g'ye ve 5 dk'ya ayarlanmış santrifüj cihazında (NÜVE- NF800) santrifüj edildi. Tüpün üst kısmındaki süpernatant kısmı, alttaki peleti bozmayacak ve alt kısımda yaklaşık 200 µl solüsyon bırakacak şekilde 1000 µl'lik otomatik pipet yardımıyla alınarak uzaklaştırıldı. Daha sonra 2 ml BO-Semenprep solüsyonu, yavaşça pellet bulunan tüp içine bırakıldı. Bu tüp 328 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün alt tarafında pelet ile birlikte yaklaşık 100 µl sıvı bırakacak şekilde üst taraftaki süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpteki 100 µl sıvı 1000 µl mikro pipet ile yavaş şekilde al ver yapılarak peletin sıvıyla karışması sağlandı. Spermatozoonları içeren bu 100 µl'lik sıvı 1,5 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alındı (Şekil 3.7). Buradan 10 µl örnek, thoma sayımı için alınarak yeni bir 1,5 ml'lik santrifüj tüpü içerisine bırakıldı. Üzerine 10 µl soğuk su konularak karıştırıldı. Bu karışımdan 10 µl örnek thoma

lamına alınarak thoma lamında 100 küçük karede (6 büyük kare ve 4 küçük kare) bulunan spermatozoonlar sayıldı (Şekil 3.8 ve 3.9). Thoma lamındaki 10 küçük karede sayılan spermatozoon sayısı, sperm süspansiyonunda ml başına 1 milyon ( $1 \times 10^6$ /ml) spermatozoon sayısına karşılık gelmektedir. Spermatozoon konsantrasyonu, IVF Bioscience prosedüründeki formüle (Şekil 3.10) göre hesaplanarak  $2,0 \times 10^6$  /ml olarak kullanıldı.



Şekil 3.7. Spermanın hazırlanması.



Şekil 3.8. Thoma laminanın hazırlanması.



**Şekil 3.9.** Thoma lamındaki spermatozoonların sayımı.

$$\text{Sperma Hacmi}(\mu\text{l}) = \frac{2.0 \times 10^6 \times A}{B \times 10^6}$$

**Şekil 3.10.** Fertilizasyon medyumuna katılması gereken sperma hacminin hesaplanması formülü.

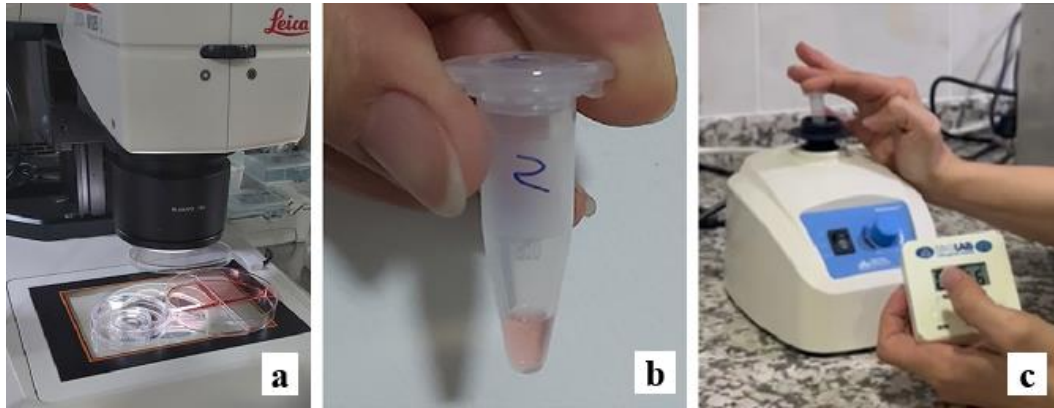
### 3.5. *In Vitro* Kültür

Embriyoların kültürü işleminde solüsyon olarak ticari BO-IVC medyumunu (IVF Bioscience, 71005) kullanıldı. Kültür işlemi IVF Bioscience protokolünün modifikasyonu ile yapıldı (Anonim, 2022). Kültür medyumunu petrisi, 500 µl kültür medyumunda 35-40 embriyo konulacak şekilde üzeri mineral oil (Sigma M8410) ile kaplanarak hazırlandı. Kültür gününden 1 gün önce hazırlanan tüm solüsyonlar (IVC ve %10 FBS içeren TCM-199) 38,5 °C, %6 CO<sub>2</sub> ve yüksek nem içeren inkübatöre yerleştirilerek gazlandı.

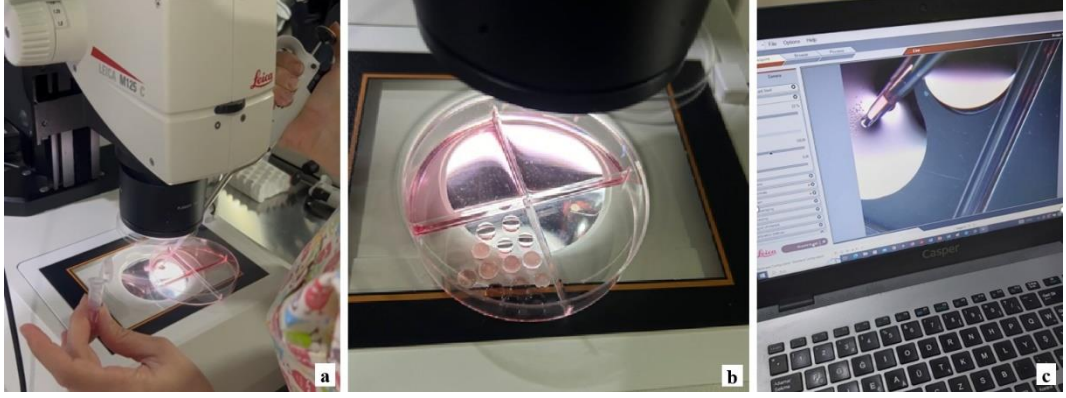
Olası fertilize oositlerin kumulus hücrelerinden soyulması Güler (2018)'in bildirdiğinin modifikasyonu ile yapıldı. Oositler, %10 FBS içeren TCM-199 (Sigma M2520) medyumundan 80 µl konulan 1,5 ml'lik santrifüj tüpü içerisine

maksimum 20 µl hacimde alındı. Daha sonra oositler 7 dk boyunca vortekslenerek (Daihan-*MaXshake* VM-30) kumulus hücrelerinden soyuldu (Şekil 3.11). Vortekslenen oositler, dört bölmeli petrinin ilk bölmesine aktarıldı. İlk bölmeden alınan oositler ikinci bölmeye aktarılarak 2-3 alanda yıkandı. Ardından dört bölmeli petrinin 3. bölümünde ve %10 FBS içeren TCM-199 medyumundan oluşturulan en az 9 damlada yıkandı (Şekil 3.12). Kültüre yüklenmeden önce olası fertilize oositler (Şekil 3.13) en az 3 defa kültür medyumuyla yıkanarak 500 µl kültür medyumuna yüklendi. Kültür petrisindeki olası zigotlar, 38,5 °C, %6 CO<sub>2</sub>, %6 O<sub>2</sub>, %88 N<sub>2</sub> ve yüksek nem içeren inkübatörde kültüre edildi.

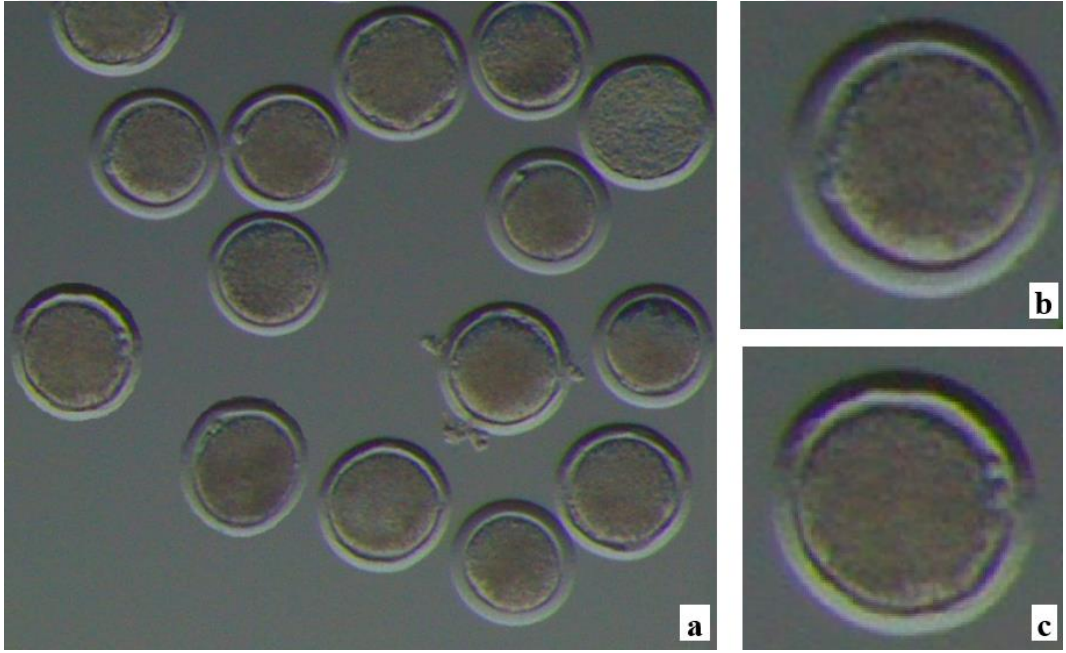
Fertilizasyonun 7. ve 8. gününde embriyolar değerlendirildi. Embriyolar, rastgele 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu için ayrılan embriyolar yeni bir IVC petrisine yüklendi. Vitrifikasyon grupları (OPS ve MP) için ayrılan embriyolar ise vitrifikasyon yöntemlerine göre vitrifiye edildi. Vitrifiye embriyolar en az 1 gün LN tankında korunduktan sonra payet içinde çözündürülerek IVC petrisine yüklendi. Grupların tümünde kültürün 24., 48. saatlerinde gelişim ve hatching\hatched oranları belirlenerek değerlendirildi.



**Şekil 3.11.** Dört bölmeli petrinin hazırlanması (a), olası zigotların vortekslenmesi için hazırlanan 1,5 ml'lik santrifüj tüpü (b), olası zigotların vortekslenmesi (c).



**Şekil 3.12.** Soyulan edilen olası zigotların dört bölmeli petrinin 1. bölmesine bırakılması (a), 3. bölmede oluşturulan yıkama damlaları (b), mikroskobun kamerasına bağlı bilgisayarın ekranında olası zigotların damlalarda aktarılması görüntüsü (c).

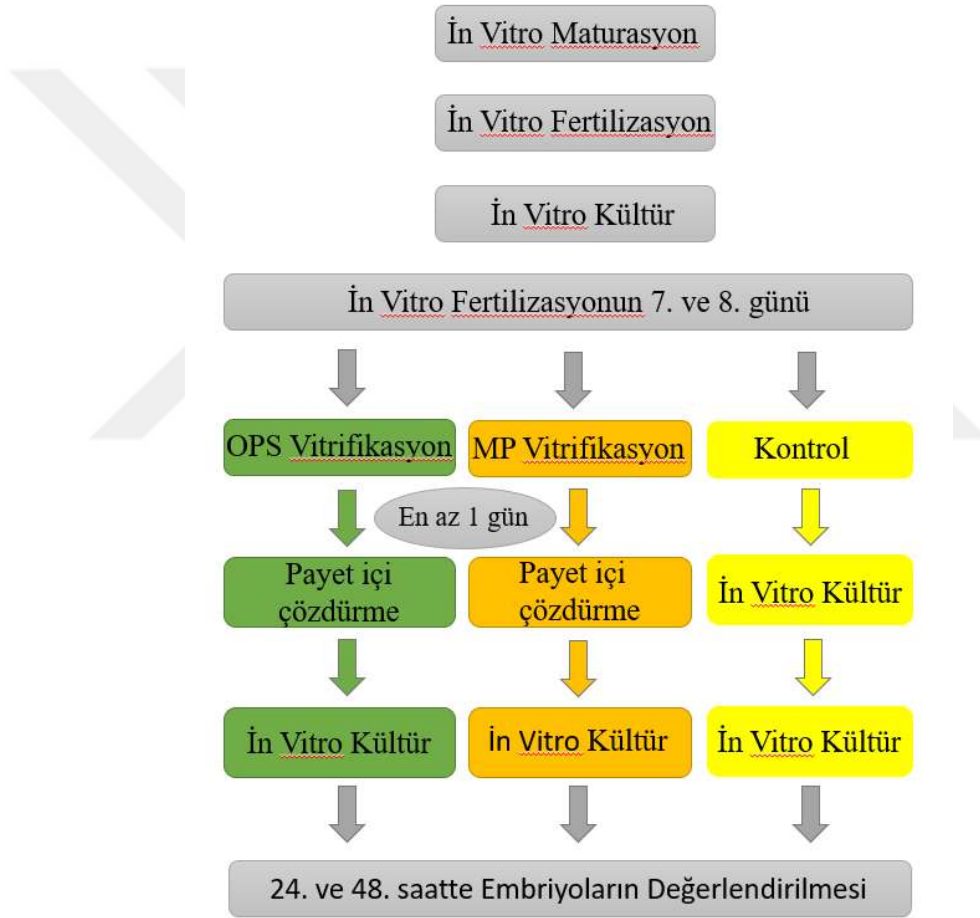


**Şekil 3.13.** Fertilizasyon sonrasında kumulus hücreleri soyulan olası fertilize oositlerin (a), 1 PB'li oositin (b) ve 2 PB'li oositin (c) görüntüsü.

### 3.6. Deney Düzenegi

Modifiye payet vitrifikasyon tekniğini test etmek amacıyla çalışmada modifiye payet grubu, yaygın kullanılan OPS vitrifikasyon tekniği ve vitrifiye edilmeyen bir kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

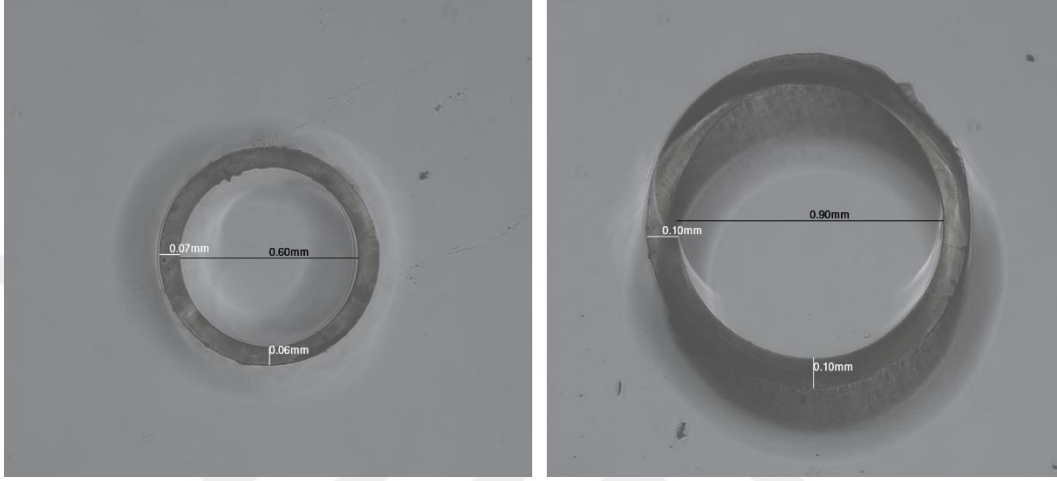
Fertilizasyonun 7. ve 8. gününde embriyolar 3 gruba ayrıldı. OPS grubundaki embriyolar OPS, MP grubundaki embriyolar MP vitrifikasyon yöntemiyle vitrifiye edilip payet içinde çözdürüldükten sonra IVC'ye yüklenirken, kontrol grubundaki embriyolar yeni bir IVC'ye yüklendi. Gruplar ayrıldığında 0. saat kabul edildi. Vitrifiye edilen gruplardaki embriyolar, çözdürüldüğünde 0. ve 24. saat re-ekspansiyon oranları bakımından incelendi. Embriyoların 24. ve 48. saat gelişim ve hatching/hatched oranları tüm gruplarda değerlendirildi. Çalışmanın deney dizaynı şekil 3.14'de verildi.



**Şekil 3.14.** Deney dizaynının şematığı.

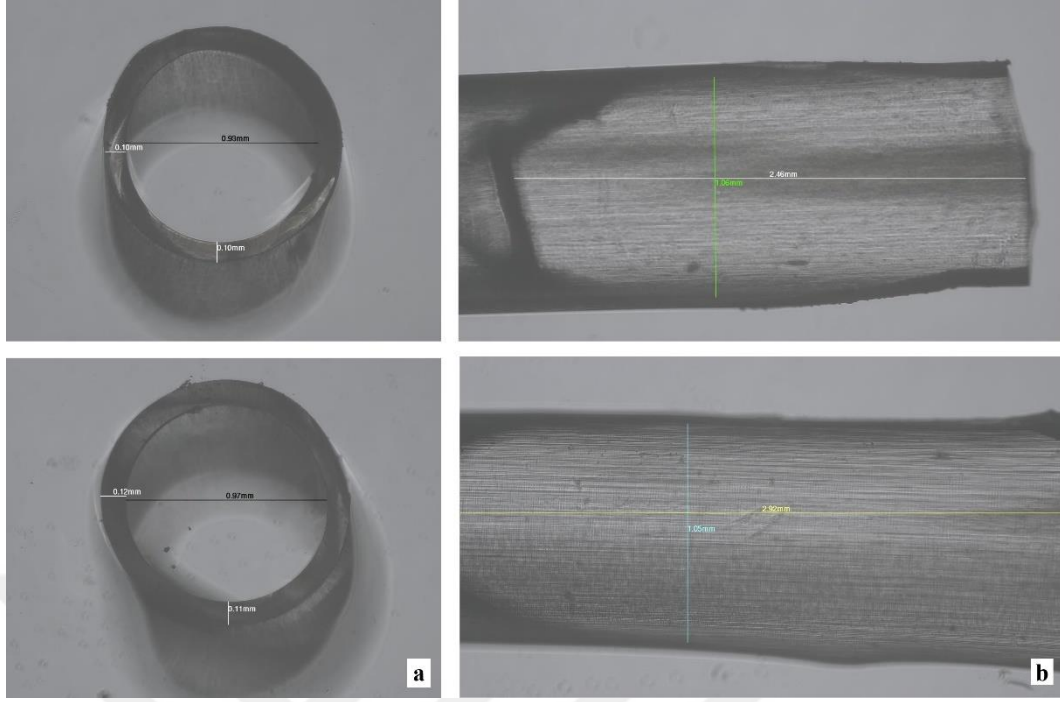
### 3.7. Vitrifikasyon Gereçlerinin Hazırlığı

Ticari OPS payetlerinin uç genişliği aynı olmadığından modifiye payetle karşılaştırabilmesi için 2 farklı OPS payetinin çapı inverted mikroskopta 40X büyütmede ölçüldü (Şekil 3.15).



**Şekil 3.15.** Farklı OPS payetlerinin çap ve duvar kalınlığı ölçümleri.

MP hazırlığı için 0,25 ml’lik payetin pamuk tıkaçı payet içinden çıkarıldı. Sonra payetin orta kısmına buhar ısısı uygulanırken payet iki ucundan çekilerek uzatıldı. Daha sonra payet, incelen orta yerinden kesilerek 2 tane payet hazırlandı. Bu işlemin amacı, 0,25 ml’lik payet duvarının kalınlığını incelterek ısı transferini kolaylaştırmak ve 0,25 ml’lik payet içinde tek adımda çözündürülmesini sağlamaktı. Payetlerin ince uçları, mikroskop altında bistüri yardımıyla kürek şeklinde kesilerek MP hazırlandı. Bu işlemin amacı ise OPS payetine (1-2  $\mu$ l) göre daha küçük hacimde ( $\leq 0,2$   $\mu$ l) embriyoları vitrifiye edecek zemini sağlayarak vitrifikasyon başarısını artırmaktı. Hazırlanan 2 farklı MP’nin ucunun çapı, duvar kalınlığı ve embriyonun yerleştirildiği uç kısmının eni ve uzunluğu inverted mikroskopta 40X büyütmede ölçüldü (Şekil 3.16).



**Şekil 3.16.** Farklı MP'lerin çapı ve duvar kalınlığı (a), embriyonun yüklendiği uç kısmın uzunluğu ve çapı (b).

### 3.8. Vitrifikasyon ve Çözdürme Solüsyonlarının Hazırlığı

Vitrifikasyon solüsyonları ve tutma medyumunu 1 gün önce hazırlanarak 0,20  $\mu$ m filtreden geçirildi. Çalışma günü vitrifikasyon solüsyonları buzdolabından çıkarılarak oda ısısına getirildi. Vitrifikasyon işlemi steromikroskopun ısıtıcı tablası kapatılarak oda sıcaklığında yapıldı. Kullanılan vitrifikasyon yöntemlerinin her biri 2 adımlı olup iki farklı solüsyon kullanıldı.

Tutma medyumunu olarak %10 FBS içeren TCM199 kullanıldı. Vitrifikasyon yöntemlerinin (OPS ve MP) birinci adımda kullanılan solüsyon (OVS1 ve MVS1), %20 FBS (v/v), %7,5 EG (v/v), %7,5 DMSO (v/v, sigma D5879) içeren TCM199 medyumudur (Martínez-Rodero ve ark., 2021; Oliveira ve ark., 2020). İkinci adımda ise OPS yönteminde kullanılan solüsyon (OVS2) %20 FBS (v/v), %16,5 EG (v/v), %16,5 DMSO (v/v) ve 0,5 M süktroz (Sigma S7903) içeren TCM199 medyumunu (Oliveira ve ark., 2020) iken, MP yönteminde kullanılan solüsyon (MVS2) %20 FBS (v/v), %15 EG (v/v), %15 DMSO (v/v) ve 0,5 M süktroz içeren TCM199 medyumuydu (Martínez-Rodero ve ark., 2021).

Çözdürme işlemi vitrifikasyon yöntemlerinde aynı olup 0,25 ml'lik payet içinde tek adımda ve 38,5 °C'de yapıldı. Çözdürme solüsyonu olarak %20 FBS (v/v) ve 0,2 M süktroz içeren TCM199 medyumunu kullanıldı. Çözdürme solüsyonu 1 gün önce 15 ml'lik konik uçlu tüp içine hazırlanarak 0,20 µm enjektör filtresinden geçirildi. Çözdürülen embriyolar IVC'ye yükleneceği için 1 gün önceden OPS ve MP grubu için ayrı ayrı IVC petrisi ve yıkama godesi hazırlandı. Çözdürme solüsyonu, IVC petrisi ve godesi 38,5 °C, %6 CO<sub>2</sub>, %6 O<sub>2</sub>, %88 N<sub>2</sub> ve yüksek nem içeren inkübatörde gazlandı.

### 3.9. Embriyoların Vitrifikasyonu

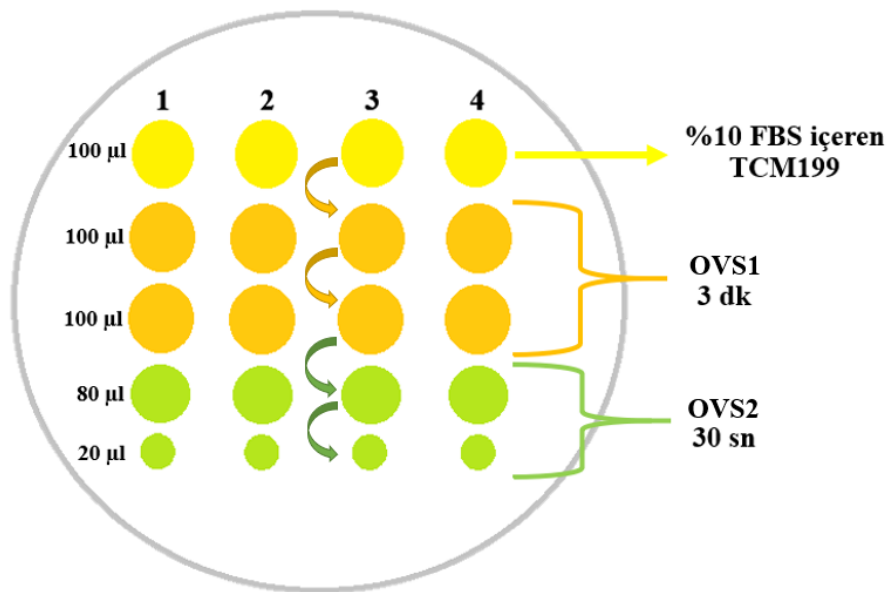
Vitrifikasyon işlemine başlamadan önce hazırlık yapıldı. Stereomikroskopun ısıtıcı tablası kapatıldı. Kriyokane ve goblet üzerine vitrifikasyon yöntemine özgü kod ve tarih yazıldı. Kod olarak OPS metodunda OV1, OV2 gibi kod kullanılırken MP metodunda MV1, MV2 kodu kullanıldı. Vitrifikasyon petrisi ve LN içeren strafor köpük kutu hazırlandı (Şekil 3.17). Embriyolar inkübatörden çıkarılarak %10 FBS içeren TCM-199 medyumuyla en az 3 kez yıkanarak mineral yağdan arındırıldı. Hazır olan vitrifikasyon petrisinin %10 FBS içeren TCM-199 medyumundan oluşturulan 1. damlalara 1'er embriyo konuldu.



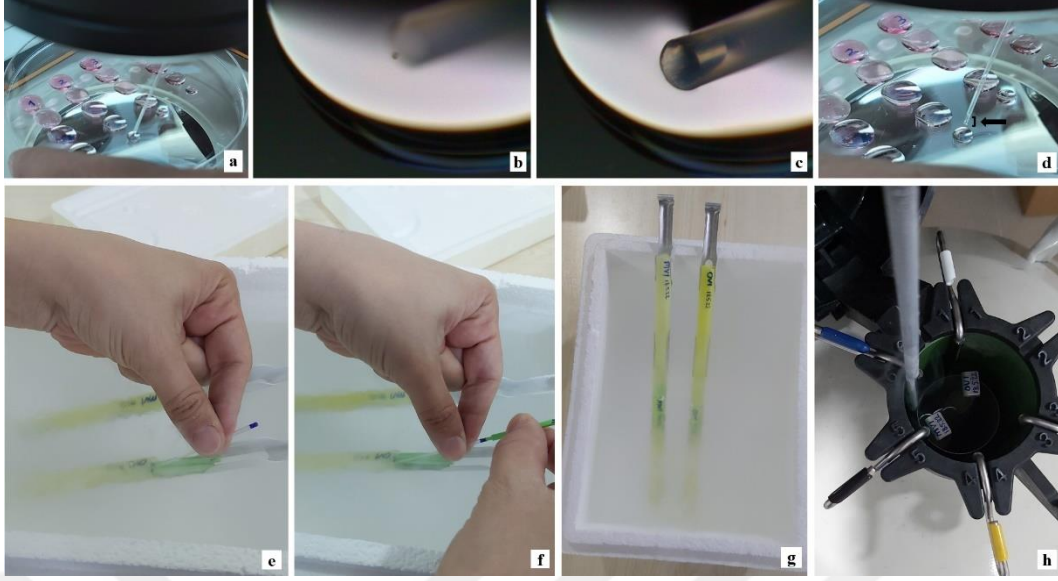
Şekil 3.17. Vitrifikasyon için hazırlık.

### 3.9.1. OPS Vitrifikasyonu

Embriyonun solüsyonlara aktarma işleminde 10 µl'lik mikro pipet kullanıldı. Embriyo farklı solüsyona aktarılacağına mikropipet ucu değiştirilerek aktarılacağı damladan solüsyon çekildi. Tutma medyumuna içindeki embriyo, OVS1 içine aktarılarak 3 dk'ya ayarlanmış kronometre çalıştırıldı. Bu damlada embriyo farklı yerlerde al ver işlemiyle yıkanıp yeni bir OVS1 damlasına aktarıldı. OVS1'de 3 dk maruz kalan embriyo, OVS2 içine aktarılarak 30 sn'ye ayarlanmış kronometre çalıştırıldı. Burada farklı yerlerde yıkanan embriyo hemen yeni bir OVS2 damlasına aktarıldı (Şekil 3.18). Daha sonra embriyo, kapillar etki sayesinde OPS payetinin ince ucundan çekilerek yüklendi (Şekil 3.19). Kronometredeki 30 sn bittiğinde OPS payetinin ince kısmı, 45 derece açıyla LN içeren goblet içine daldırıldı (Şekil 3.19). OPS payetinin yarısı LN içine daldırıldığında LN'de birkaç sn'ye kaynama oluştu. Bu kaynama kesildiğinde OPS payetinin kalın ucuna tıkaç yerleştirilerek payetinin tamamı goblet içine gönderildi (Şekil 3.19). Kriyokaneye takılı alt goblet içindeki OPS payetleri, vitrifikasyon işlemi bittiğinde üstten goblet ile kapatıldı. Bu işlem, OPS payetlerinin LN tankından çıkarılırken herhangi bir yere takılarak kırılmasını ve LN'de yüzmesini önlemek için yapıldı. Daha sonra kriyokaneler LN tankındaki bir kanistere yerleştirildi. Çalışma boyunca gerekli bilgiler not edildi.



**Şekil 3.18.** OPS vitrifikasyon petrisinin şematiği.

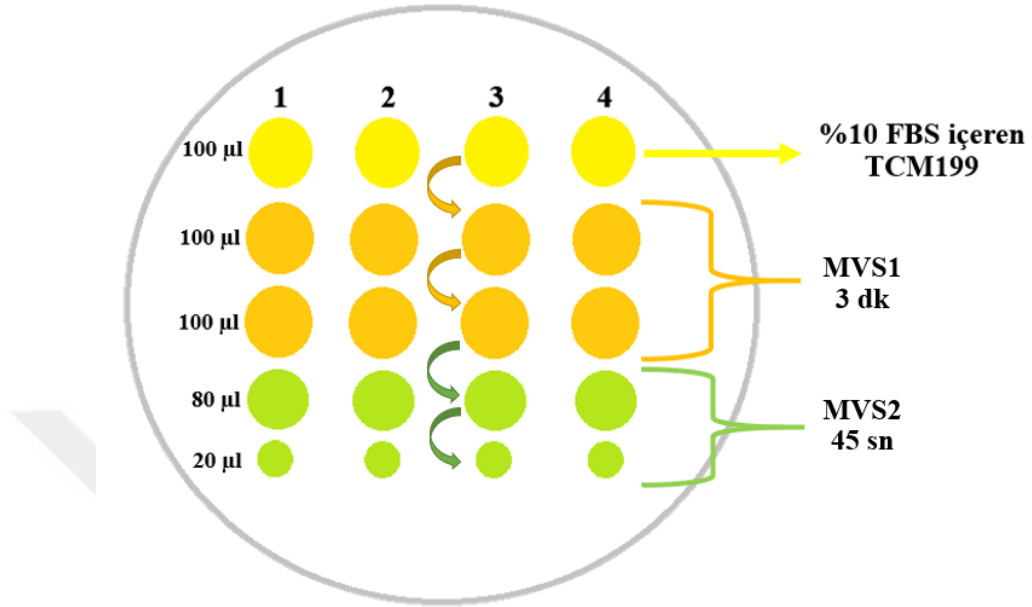


**Şekil 3.19.** OPS vitrifikasyonu görselleri. Embriyonun OPS payetine yüklenmesi (a, b, c ve d), LN'a daldırılması (e), vitrifiye olduktan sonra tıkaçının takılması (f), gobletlerin üst kapaklarının kapatılıp (g) LN tankında kanister içine yerleştirilmesi (h).

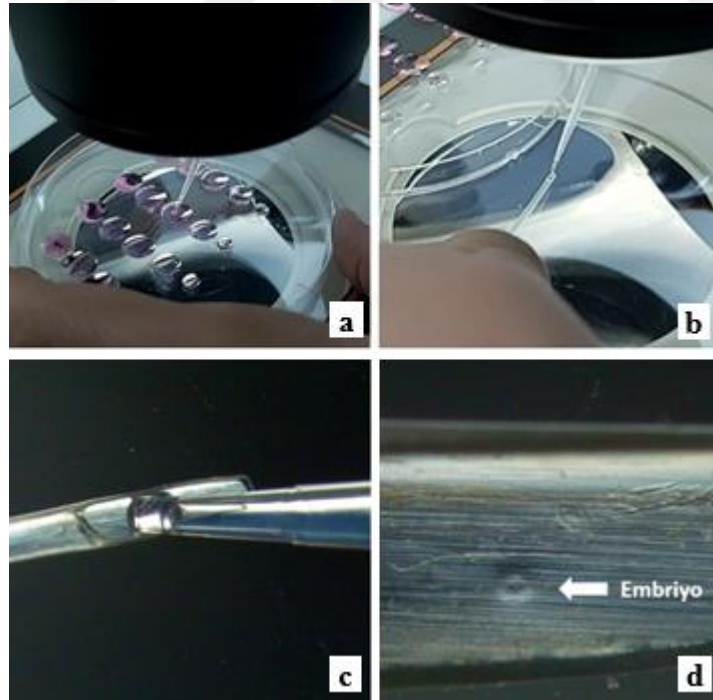
### 3.9.2. MP Vitrifikasyonu

Embriyonun solüsyonlara aktarma işleminde 10 µl'lik mikro pipet kullanıldı. Embriyo farklı solüsyona aktarılacağına mikropipet ucu değiştirilerek aktarılacağı damladan solüsyon çekildi. Tutma medyumundaki embriyo, MVS1 içine aktarılarak 3 dk'ya ayarlanmış kronometre çalıştırıldı. Embriyo bu damlada farklı yerlerde al ver işlemiyle yıkanıp yeni bir MVS1 damlasına aktarıldı. Embriyo MVS1'de 3 dk maruz kaldıktan sonra, MVS2 içine aktarılarak 45 sn'ye ayarlanmış kronometre çalıştırıldı. Burada farklı yerlerde yıkanan embriyo yeni bir MVS2 damlasına aktarıldı (Şekil 3.20). Daha sonra embriyo, 0,2 µl'ye ayarlı mikropipet yardımıyla MP üzerine yerleştirildi (Şekil 3.21). Embriyo MP üzerine yerleştirildikten sonra pipet içinde kalan (embriyoyu almadan önce çekilen) MVS2 solüsyonu atıldı. Böylece embriyonun vitrifiye edildiği hacim  $\leq 0,2 \mu\text{l}$  oldu. Kronometredeki 45 sn bitince MP'nin ucu, 45 derece açıyla LN içeren goblet içine daldırıldı. MP'nin yarısı LN içine daldırıldığında LN'de birkaç sn'ye kaynama oluştu. Bu kaynama kesildiğinde MP'nin kalın ucuna tıkaç yerleştirilerek MP'nin tamamı goblet içine gönderildi. Kriyokaneye takılı alt goblet içindeki MP'ler,

vitريفikasyon işlemleri bittiğinde üstten goblet ile kapatıldı. Daha sonra kriyokaneller LN tankındaki bir kanistere yerleştirildi. Çalışma boyunca gerekli bilgiler not edildi.



Şekil 3.20. MP vitريفikasyon petrisinin şematifi.



Şekil 3.21. MP vitريفikasyonu görselleri. Embriyonun vitريفikasyon solüsyonu damlalarından aktarılması (a), MP üzerine yüklenirken makroskopik (b) ve mikroskopik (c ve d) görünimleri.

### 3.10. Vitrifiye Embriyoların Çözdürülmesi

Vitrifiye edilen embriyolar en az 1 gün LN tankında saklandıktan sonra çözdürüldü. Çözdürmeden 1 gün önce hazırlanan çözdürme medyumunu, embriyoların kültürlenmesi için hazırlanan IVC petrisi, kültür petrisine yüklenmeden önce embriyoların kültür medyumuyla yıkanması ve çözdürme sonrası kültür medyumunda beklemesi için 1 ml IVC medyumunu içeren 1,5 ml'lik santrifüj tüpü ağzı açık şekilde CO<sub>2</sub>'li etüvde gazlandı. Çözdürme işlemine başlamadan önce su banyosu içine tüp standı konuldu. Tüp standının üzerine distile su içeren 15 ml'lik konik uçlu tüpler yerleştirildi. Su banyosu çalıştırıldı. Bununla birlikte insülin enjektörleri, 0,25 ml'lik payetler, kronometreler, makas, kâğıt havlu, mikropipet uçları gibi kullanılacak malzemeler çıkarıldı. Vitrifikasyon gruplarındaki embriyoların karışmaması için 30 mm'lik petrinin dış alt tarafından asetat kalemle O ve M harfi yazıldı. O harfli damlaya OPS grubundaki embriyolar yerleştirilirken, M harfli damlaya MP grubu embriyolar yerleştirildi. Bu harflerin üzerine doğru 150 µl'lik IVC damlası oluşturuldu. Damlaların hızlı buharlaşmasını engellemek için damlaların tam üst noktasını örtmeyecek şekilde damlalar mineral oil ile kaplandı (Şekil 3.22). Damlalara embriyo yerleştirilirken mineral oil ile kaplı olmayan üst alandan damla içine girildi. Payet içinde çözdürülen embriyoların aktarılacağı ve çözdürme solüsyonu içeren 30 mm'lik petri hazırlandı (Şekil 3.22). Çözdürme solüsyonu 0,25 ml'lik payetlere 2 bölüm 2 hava oluşturacak şekilde çekildi (Şekil 3.22). Bu şekilde payet hazırlandığında, embriyo payet içinde çözdürüldüğünde aşağıya doğru düşeceği için ilk hava bariyeri sayesinde pamuk tıkaca temasının önlenmesi sağlandı. Payetin ucundaki ikinci hava ise vitrifikasyon gereçlerinin payete daldırılmasıyla çözdürme medyumunun taşması ve olası embriyo kaybı engellendi. Çözdürme solüsyonu çekilen 0,25 ml'lik payetler, pamuk tıkacı altta olacak şekilde 38,5 °C'ye ayarlanmış su banyosu içindeki 15 ml'lik konik uçlu tüp içine yerleştirildi (Şekil 3.22). Bu şekilde payet içindeki çözdürme solüsyonunun ısı 38,5 °C'de sabitlendi. Strafor köpük kutu içine LN doldurulduktan sonra LN tankından çözdürülecek embriyoları içeren kriyokaneler çıkarıldı. Kriyokanenin üst gobleti çıkarıldı (Şekil 3.23). Kronometre 5 dk'ya ayarlandı. Vitrifikasyon gereci (OPS ve MP) LN'den çıkarılmadan hemen önce

payet tıkaçı çıkarıldı (Şekil 3.23). Daha sonra vitrifikasyon gereci LN'den çıkarılıp sadece embrioyu içeren ucu çözdüreme solüsyonu içeren 0,25 ml'lik payet içine yerleştirilerek kronometre çalıştırıldı (Şekil 3.23). Vitrifikasyon gerecinin LN'den çıkarılıp çözdüreme medyumuna içeren payet içine yerleştirilinceye kadar oda sıcaklığında geçen süre 1-2 sn idi. Kronometrede 45 sn geçtiğinde vitrifikasyon gereci 0,25 ml'lik payet içinden çıkarılarak çözdüreme solüsyonu içeren 30 mm'lik petri içinde embriyonun vitrifikasyon gerecinden düşüp düşmediği kontrol edildi. Kronometrede 5 dk dolunca embriyo 0,25 ml'lik payetin pamuk tıkaçının altından kesilerek çözdüreme solüsyonu içeren 30 mm'lik petri içine aktarıldı (Şekil 3.23). Burada bulunan embriyo hangi gruba aitse hemen grubunun (O veya M harfin üzerindeki) IVC damlasına alındı (Şekil 3.23). Embriyoların çözündürülmesi bittiğinde MP ve OPS grubu ayrı ayrı IVC medyumuyla en az 3 kez yıkanarak mineral oil ile kaplı olan IVC petrisine aktarıldı. Petrinin alt tarafının duvarına ve üst kapağına grup adı (Kontrol, OPS ve MP) yazılarak inkübatöre kaldırıldı.



**Şekil 3.22.** Çözdüreme işleminden önce yapılan hazırlık.



**Şekil 3.23.** Çözdürme işlemi.

### **3.11. Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi**

Çözdürüldükten sonra IVC'ye yüklenen embriyoların 0. saat kabul edilerek re-ekspansiyonları not edildi. Bununla birlikte embriyoların 24. saat re-ekspansiyonları da değerlendirildi. Kültürün 24. ve 48. saatlerinde gelişim ve hatching/hatched oranları not edildi.

### **3.12. İstatistiksel Analiz**

Elde edilen veriler Excell programında tablo haline getirildikten sonra Minitab ve SPSS programında Ki-kare testi ile analiz edildi. Testlerin anlamlılık düzeyi için  $P < 0,05$  değeri kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Mezbahada kesilen dişi sığırlardan alınan 132 ovaryumdan 1.217 immatür oosit elde edildi. Bu immatür oositlerin 576'sı A kalite, 241'i B kalite, 278'i C kalite ve 122'si D kalite olduğu belirlendi (Tablo 4.1). Ovaryum başına elde edilen oosit sayısı 9,22 iken ovaryum başına elde edilen A kalite oosit sayısı 4,36 idi. Çalışmaya 576 adet A kaliteli immatür oosit dahil edilerek maturasyon işlemine alındı.

**Tablo 4.1.** Kullanılan ovaryum sayısı ve elde edilen kalitelere göre immatür oosit sayıları.

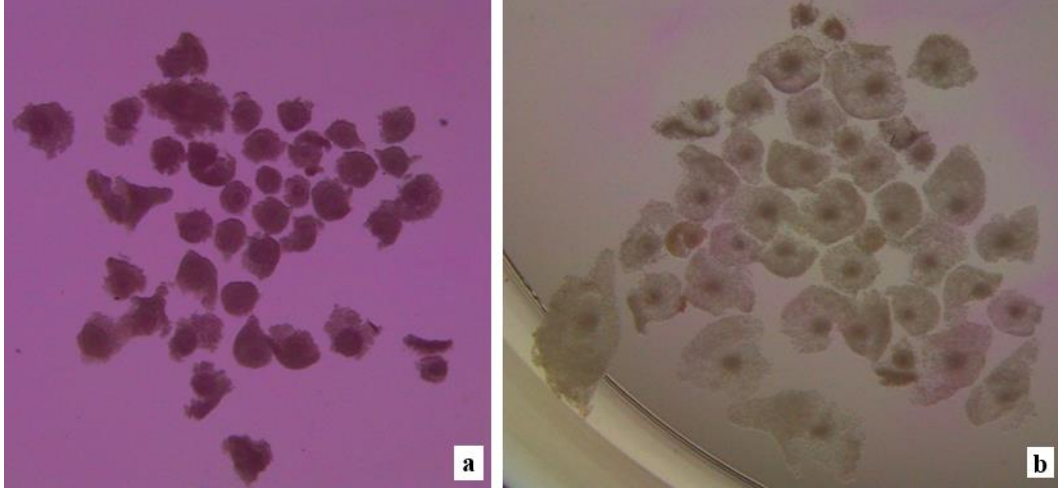
| Kullanılan Ovaryum Sayısı | Toplam Oosit Sayısı | A Kalite Oosit Sayısı | B Kalite Oosit Sayısı | C Kalite Oosit Sayısı | D Kalite Oosit Sayısı | Ovaryum Başına A Kaliteli Oosit Sayısı |
|---------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------------|
| 132                       | 1.217               | 576                   | 241                   | 278                   | 122                   | 4,36                                   |

##### 4.1. Maturasyon Sonrası Bulgular

İmmatür oositler, maturasyonun 21-22. saatinde kumulus ekspansiyonu yönünden değerlendirildi. Kumulus ekspansiyonu 0. derece, 1. derece ve 2. derece olmak üzere 3 gruptaki değerlendirmeye (Şekil 4.1) göre 0. derecede olan 52 oosit çalışma dışı bırakılırken, 1. ve 2. derecede olan 524 oosit sırasıyla *in vitro* fertilizasyon ve IVC işlemine dahil edildi (Şekil 4.2 ve Tablo 4.2).



**Şekil 4.1.** Maturasyon sonrası kumulus ekspansiyonunun değerlendirilmesi.



**Şekil 4.2.** Maturasyon medyumuna yüklenen immatür oositlerin (a) ve maturasyon sonrasında oositlerin görünümü (b).

**Tablo 4.2.** Maturasyon sonrası kumulus ekspansiyonunun değerlendirilmesi.

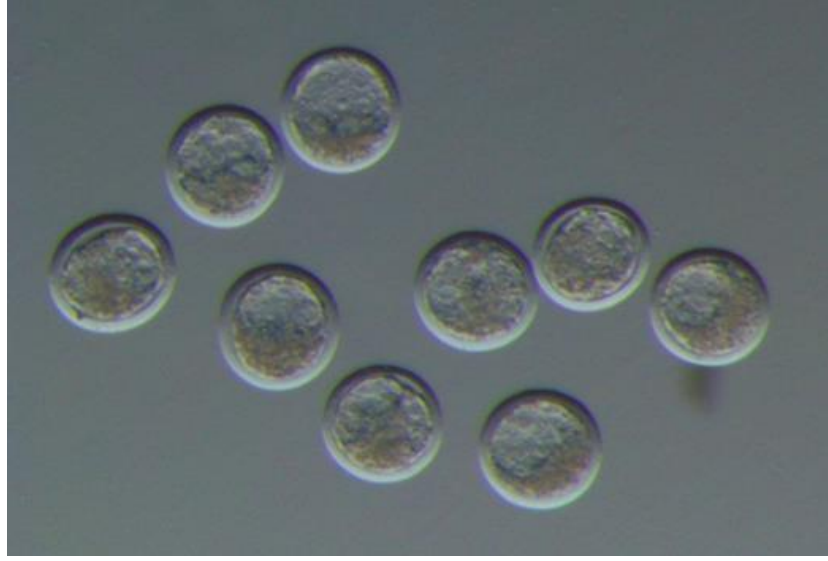
| Maturasyona Alınan Oosit Sayısı | Kumulus Ekspansiyonu Değerlendirmesi |               |
|---------------------------------|--------------------------------------|---------------|
|                                 | 1. ve 2. Derece (%)                  | 0. Derece (%) |
| 576                             | 524 (90,97)                          | 52 (9,03)     |

#### 4.2. Embriyoların Kültür Sonrası Bulguları

Maturasyona yüklenmiş olan 576 oositin 524'ü fertilizasyona yüklendi ve fertilizasyonun 24. saatinde olası zigot kabul edilerek IVC'ye alındı. Çalışmada 576 oositin 75 tane (%13,02) farklı blastosist aşamalarında embriyo üretildi. Fertilizasyonun 7. ve 8. gününde gelişen 6 erken blastosist, 42 blastosist ve 27 ekspanded blastosist olmak üzere toplam 75 embriyo 3 gruba (OPS, MP ve kontrol) eşit embriyo aşamalarında olacak şekilde eşit sayılarda bölündü (Şekil 4.3). Kontrol grubundaki 25 embriyo yeni bir IVC petrisine yüklenirken, vitrifikasyon gruplarındaki (OPS ve MP) 25 embriyo vitrifikasyon gruplarına uygun şekilde vitrifiye edildi (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** Embriyo aşamalarının gruplara dağılımı.

|         | Erken Blastosist Sayısı | Blastosist Sayısı | Ekspanded Blastosist Sayısı | Toplam Embriyo Sayısı |
|---------|-------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------|
| OPS     | 2                       | 14                | 9                           | 25                    |
| MP      | 2                       | 14                | 9                           | 25                    |
| Kontrol | 2                       | 14                | 9                           | 25                    |



**Şekil 4.3.** Fertilizasyonun 7. günü embriyolar.

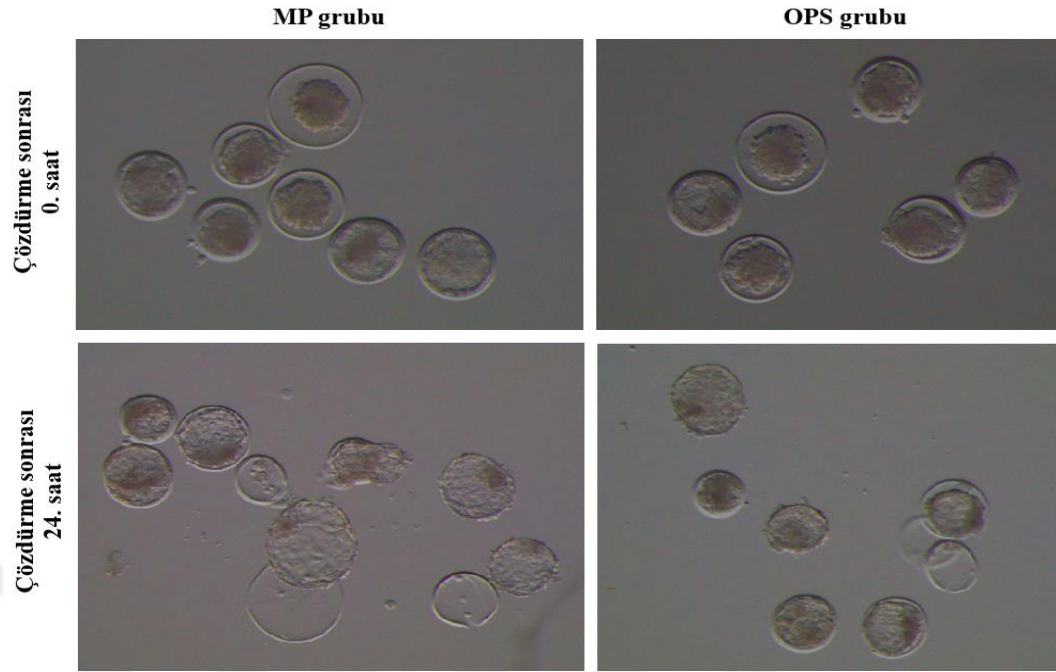
#### 4.3. Vitrifiye Embriyoların Çözdürme Sonrası Bulguları

Vitrifikasyon yöntemlerinin (OPS ve MP) her birinde 2 erken blastosist, 14 blastosist ve 9 ekspanded blastosist olmak üzere toplam 25 embriyo vitrifiye edildikten en az 1 gün sonra payet içinde tek adımda çözdürüldü. Çözdürme sonrasında embriyolar döndürülerek incelendiğinde her iki vitrifikasyon grubunda zona pellusida kırılması veya çatlaması görülmedi. Çözdürme sonrası iki vitrifikasyon grubundaki embriyoların re-ekspansiyon oranları ve tüm çalışma gruplarının 24. ve 48. saat gelişim ve hatching+ hatched oranları tablo 4.4’de verildi (Şekil 4.4; şekil 4.5).

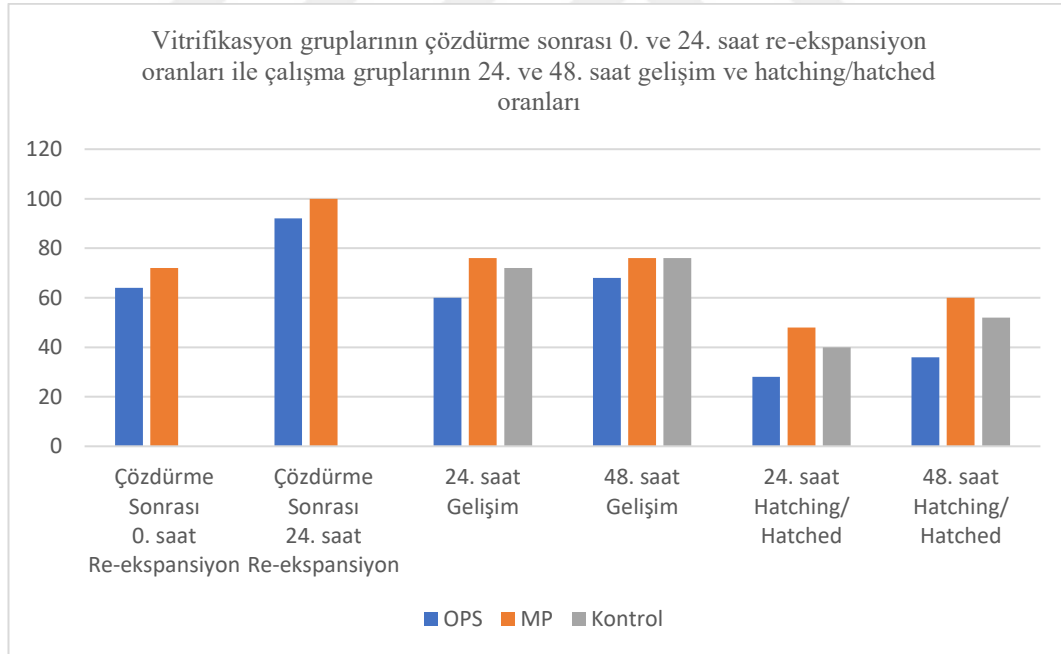
**Tablo 4.4.** Çözdürülen vitrifiye embriyoların re-ekspansiyon, gelişim ve hatching+hatched oranları.

| GRUPLAR        | Re-ekspansiyon       |                       | 24. Saat             |                        | 48. Saat             |                        |
|----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
|                | 0. saat (%)          | 24. saat (%)          | Gelişim (%)          | Hatching + Hatched (%) | Gelişim (%)          | Hatching + Hatched (%) |
| OPS (n=25)     | 16 (64) <sup>a</sup> | 23 (92) <sup>a</sup>  | 15 (60) <sup>a</sup> | 7 (28) <sup>a</sup>    | 17 (68) <sup>a</sup> | 9 (36) <sup>a</sup>    |
| MP (n=25)      | 18 (72) <sup>a</sup> | 25 (100) <sup>a</sup> | 19 (76) <sup>a</sup> | 12 (48) <sup>a</sup>   | 19 (76) <sup>a</sup> | 15 (60) <sup>a</sup>   |
| Kontrol (n=25) | Değerlendirilmedi    |                       | 18 (72) <sup>a</sup> | 10 (40) <sup>a</sup>   | 19 (76) <sup>a</sup> | 13 (52) <sup>a</sup>   |
| p              | -                    | -                     | -                    | -                      | -                    | -                      |

- : Aynı sütunda gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak önemli değildir (p≥ 0,05).



**Şekil 4.4.** Vitrifikasyon gruplarındaki embriyoların çözündürme sonrası 0. saat ve 24. saat görünüşleri.



**Şekil 4.5.** Vitrifikasyon gruplarının çözündürme sonrası 0. ve 24. saat re-ekspansiyon oranları ile çalışma gruplarının 24. ve 48. saat gelişim ve hatching/hatched oranları.

Değerlendirme sonrasında OPS grubunda çözündürülen embriyoların 0. ve 24. saat re-ekspansiyon oranları sırasıyla %64 ve %92 iken MP grubunda %72 ve %100

idi. Vitrifikasyon grupları arasında 0. ve 24. re-ekspansiyon oranlarında önemli bir istatistiki fark bulunmadı ( $p \geq 0,05$ ).

Çözdürme sonrası 24. ve 48. saatlerinde gelişim oranları sırasıyla OPS grubunda %60 ve %68 iken MP grubunda %76 ve %76 idi. Kontrol grubunun 24. ve 48. saatlerinde gelişim oranları ise %72 ve %76 olup vitrifikasyon grupları ile arasında önemli bir istatistiki fark bulunmadı ( $p \geq 0,05$ ). Vitrifikasyon grupları arasında 24. ve 48. saatlerinde gelişim oranlarında önemli bir istatistiki fark bulunmadı ( $p \geq 0,05$ ).

Çözdürme sonrası 24. ve 48. saatlerinde hatching+hatched oranları sırasıyla OPS grubunda %28 ve %36 iken MP grubunda %48 ve %60 idi. Kontrol grubunun 24. ve 48. saatlerinde hatching+hatched oranları sırasıyla %40 ve %52 idi. Vitrifikasyon grupları ile kontrol grubu arasında 24. ve 48. saatlerinde hatching+hatched oranlarında önemli bir istatistiki fark bulunmadı ( $p \geq 0,05$ ). Vitrifikasyon grupları arasında 24. ve 48. saatlerinde hatching+hatched oranlarında önemli bir istatistiki fark bulunmadı ( $p \geq 0,05$ ). Bununla birlikte 48. saat hatching+hatched oranları incelendiğinde OPS grubu kontrol grubundan %16 oransal bir farkla düşük olduğu belirlenirken MP grubunun kontrol grubuna oransal olarak yakın olması dikkat çekiciydi. Bununla birlikte MP grubunun 48. saat hatching+hatched oranlarının OPS grubundan %24 oransal bir farkla daha yüksek olduğu görüldü.

## 5. TARTIŞMA

Vitrifikasyon yönteminde vitrifiye edilen hacim ve KP konsantrasyonu azaltılarak vitrifikasyonun başarı olasılığı artırılmıştır (Yavin ve Arav, 2007). Vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezerve edilen embriyolar çözündürülürken aşamalı olarak, azalan yoğunluktaki solüsyonlara maruz kalma işlemlerinden geçmektedir. Bu işlemlerin laboratuvar ve deneyimli kişi gereksinimi zorunlu hale getirmesi vitrifikasyonun, yavaş dondurma yöntemi gibi yaygın kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu problemin üstesinden gelmek için 0,25 ml'lik payet içinde işlemsiz çözündürme yapılması düşünülmüştür. Payetlerde yapılan klasik vitrifikasyon işleminde payete çözündürme solüsyonları da konulmuş fakat istenilen başarı elde edilmemiştir. Araştırmacılar, payet içinde embriyo ile çözündürme solüsyonlarının yeterince karışmadığını ifade etmişlerdir (Satılmış ve ark., 2014). Son yıllarda, klasik vitrifikasyon yerine minimum hacim ultra hızlı vitrifikasyon yöntemleri tercih edilmektedir (Momozawa ve ark., 2023). Bu yöntemle kriyoprezerve edilen IVP embriyoları, sahada kullanım kolaylığı sağlamak için 0,25 ml'lik payetlerde tek adımda çözündürülmektedir (Inaba ve ark., 2011; Oliveira ve ark., 2020). Bu çalışmalar, vitrifikasyonun sahada yavaş dondurmanın yerini alabileceğine dair umut vermiştir. Bu araştırmada, vitrifiye edilecek hacmi 0,2 µl'nin altına düşüren ve vitrifikasyon solüsyonlarındaki KP yoğunluğunu azaltmayı hedefleyen "modifiye payet" adı verilen yeni bir vitrifikasyon yönteminin etkinliğini göstermek amaçlandı. Geliştirilen tekniğin sahada uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, 0,2 M süktroz içeren çözündürme medyumunu kullanılarak 0,25 ml'lik payetlerde tek adımda çözündürme işlemi uygulanmıştır. Modifiye payet (MP) vitrifikasyon gerecinin etkinliği, yaygın olarak kullanılan OPS yöntemi ve vitrifiye edilmeyen IVP embriyoların gelişimi ile karşılaştırılmıştır.

*İn vitro* oosit toplama yöntemleri arasında en yaygın kullanılan teknik, folikül aspirasyon yöntemidir. Sığır ovaryumlarındaki 2-8 mm çapındaki foliküller, genellikle 18 G iğne kullanılarak 10 ml'lik enjektörler yardımıyla aspire edilmektedir (Bols ve ark., 1996). Yapılan çalışmalarda ovaryum başına elde edilen oosit sayısını Cetin ve Bastan (2006) 3,47, Ün ve Küplülü (2005) 4,7, Biçici (2022) 7,98, Güler (2018) 3,96 ve Satılmış (2019) 5,73 olduğunu bildirmiştir. Sunulan

çalışmada ovaryum başına elde edilen oosit sayısı 9,22 olup, Biçici (2022)'ye paralel ve diğer araştırmacılara göre yüksek bulunmuştur. Ovaryum başına elde edilen A kaliteli oosit sayısını Cetin ve Bastan (2006) 2,41, Biçici (2022) 4,16, Güler (2018) 2,99, Satılmış (2019) 2,42, Yıldız (2022) 1,56 olduğunu ifade etmiştir. Bu araştırmada ovaryum başına elde edilen A kalite oosit sayısı 4,36 olup, Biçici (2022)'ye paralel ve diğer araştırmacılara göre yüksek bulunmuştur. Araştırmacılardan fazla sayıda oosit bulunmasının nedeni, kullanılan ovaryumlar üzerindeki toplam folikül sayısının fazla olmasından ve aspirasyon işlemi yapan kişinin el manipulasyonu farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Gordon (2003)'ün bildirdiği gibi hayvanların bakım ve beslemesi, mevsim, korpus luteum olan ovaryum sayısı ve ovaryumdaki foliküllerin fazla olmasına bağlı olarak A kaliteli oosit sayısı yüksek bulunmuş olabilir. Bu tür farklılıkları en aza indirmek amacıyla yapılan çalışmalarda, ovaryumların folikül sayılarına göre sınıflandırılması önerilmektedir. Speckhart ve ark. (2023), *in vitro* sığır embriyosu üretim protokolünde ovaryumları folikül sayılarına göre şu şekilde sınıflandırmıştır: 10 veya daha fazla folikül içerenler yüksek kaliteli, 6-10 folikül içerenler orta kaliteli, 5 veya daha az folikül içerenler düşük kaliteli ovaryumlar olarak tanımlanmıştır. Benzer şekilde, Florida Üniversitesi'nde P.J. Hansen, 20'den fazla küçük ve orta boy folikül içeren ovaryumları iyi, 10'dan fazla folikül içerenleri orta, 10'dan az folikül içerenleri ise kötü olarak değerlendirmiştir (Anonim 2024d). Ovaryumların sınıflandırılmasına yönelik standardizasyon, oosit verimliliği ve kalitesi üzerine yapılan araştırmalarda daha doğru karşılaştırmalar yapılmasını sağlayabilir.

Maturasyon *in vitro* embriyo üretiminin ilk aşaması olup sitoplazmik ve nükleer maturasyon olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Maturasyonun başarılı olması, *in vitro* embriyo üretiminin fertilizasyon ve kültür basamaklarını etkileyeceğinden dolayı önem arz etmektedir. Maturasyon; kumulus ekspansiyonu, perivitellin boşlukta polar body varlığı ve kromozom konfigürasyonuna bakılarak değerlendirilmektedir (Gordon, 2003; Güler, 2018). Maturasyon sonrası kumulus ekspansiyonu, kumulus hücrelerinin genişlemesine göre sınıflandırılarak değerlendirilir (Kobayashi ve ark., 1994). Daha sonra kumulus hücreleri soyularak

perivitellin boşlukta polar body varlığına bakılabilmektedir. Bunların dışında oositler Hoechst 33342 (Mayes, 2002) veya aseto-orsein (Hurt ve ark., 2000) gibi boyalarla boyanarak kromozom durumunun MII olup olmadığı değerlendirilmektedir. Fertilizasyon sırasında kumulus hücrelerinin varlığı akrozom reaksiyonunu uyarmakta ve blastosist gelişimini olumlu etkilemektedir (Fukui, 1990). Bundan dolayı bu çalışmada maturasyon değerlendirmesi sadece oositlerin kumulus ekspansiyonuna bakılarak yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda maturasyon oranlarını Yıldız (2022) %94,91, Biçici (2022) %73,82, Satılmış (2019) %87,4, Güler (2018) %96, Cetin ve Bastan (2006) %95,14 olduğunu bildirmiştir. Sunulan çalışmada bulunan %90,97 kumulus ekspansiyonu, Biçici (2022)'den yüksek diğer araştırmacılarla paralel sonuçlar vermiştir. Bu farklılığın sebebinin oosit kalitesini belirlemede operatöre bağlı bireysel farklılıklar ve aynı oosit kalite sınıflandırmasının kullanılmamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Morfolojik olarak kaliteli görünen oositin gelişimsel yeteneği veya oosit içindeki mitokondri sayıları vs. saptanamadığı için çalışmalar arasında farklı sonuçların görülmesinin şaşırtıcı bir durum olmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte *in vitro* maturasyonu, oositleri alınan hayvanın bakım ve beslenme durumu, siklus dönemi, folikül çapları, inkübatördeki atmosferik ortam ve nem, maturasyon süresi, medyum içeriği, kullanılan medyumların pH ile osmotik basıncı gibi faktörler etkileyebilmektedir (Gordon, 2003).

*In vitro* sığır embriyosu üretiminde embriyo gelişimini iyileştirmeye yönelik büyük çabalara rağmen embriyo üretim verimliliğinin düşük kaldığı bildirilmiştir (Marsico ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda blastosist oranlarının %6,43 (Bodu ve ark., 2024), %7,5 (Satılmış, 2019), %22,81 (Biçici, 2022), %26,45 (Dos Santos ve ark., 2019), %39,9 (Sanches ve ark., 2013) gibi geniş bir aralıkta değiştiği görülmektedir. Çalışmamızdaki blastosist oranı %13,02 olup Satılmış (2019) ve Bodu ve ark. (2024)'dan nispeten yüksek bulunurken, Biçici (2022), Dos Santos ve ark. (2019) ve Sanches ve ark. (2013)'dan düşük bulunmuştur. Blastosist oranlarında farklılıkların en büyük nedeni oosit ve spermaya ilişkin faktörler, kültür medyumlarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Lonergan ve ark., 2003; Rizos ve ark., 2002).

Embriyoların kriyoprezervasyonunda karşılaşılması muhtemel sorunlardan birisi kırılma hasarıdır. Embriyoların zona pellusida ve blastomerlerinde kırık hasarları, dondurma veya çözme sırasında genellikle -50°C ve -150°C arasındaki sıcaklık bölgesinde katılaşmış solüsyonun mekanik etkisiyle oluştuğu bilinmektedir (Rall ve Meyer, 1989). Payetler direkt su banyosunda çözülürken zona pellusida kırılmasının arttığı bildirilmiştir (Jones, 2021). Bundan dolayı çözme öncesi payet, 5-10 sn havada bekletilmektedir (Rall ve Meyer, 1989; Hasler, 2002). Ultra hızlı vitrifikasyonun çözme aşamasında birçok araştırmacı vitrifikasyon gereçlerinin havada geçirdiği süreye değinmemiştir (Martínez-Rodero ve ark., 2024; Oliveira ve ark., 2020; Salzano ve ark., 2014). Bununla birlikte vitrifikasyon gereçlerinin 3-4 sn sürelerde havada tutulduğunu ifade eden araştırmacılarda bulunmaktadır (Caamaño ve ark., 2015; de Camargo ve ark., 2022; Sanches ve ark., 2013; Valente ve ark., 2024). Bu araştırmacılar çözme sonrası zona pellusida kırılma oranı bildirmemişlerdir. Vitrifikasyon hacmi 1 µl'nin üzerinde olduğunda vitrifiye edilen damlada kırıklıklar gözlemlendiği, vitrifiye edilen hacmin azaltılmasının soğutma hızını arttırdığı ve buz kristali çekirdeklenme olasılığını azalttığı bildirilmektedir (Arav ve ark., 2002). Sıvı azot ile doğrudan temas eden küçük hacimler (0,1- 0,5 µl) ve düşük KP konsantrasyonlarının solüsyonda kırılma riskini azalttığı bildirilmiştir (Arav ve ark., 2002). Klasik payet kullanılarak 10 µl hacimde vitrifiye edilen embriyolar çözülürken 5 sn havada tutulmasına rağmen %6,78 oranında zona pellusida kırığı gözlemlenmiştir (Yıldız, 2022). Sunulan çalışmada 1-2 sn havada kalma sonrasında embriyolar çözülürken hiç zona pellusida kırığı gözlenmemiştir. Embriyoların OPS'de <1 µl ve MP'de ise <0,2 µl hacimde vitrifiye edilmesine bağlı olarak Arav ve ark. (2002)'nin bildirdiği şekilde çok düşük hacimlerin kırık hasarı oluşmasını engellediği düşünülmektedir. Buna ilaveten vitrifikasyon gereçlerinin çözülürken 1-2 sn oda sıcaklığında kalması da zona kırığını engellemiş olabilir. Ultra hızlı vitrifikasyonda havada kalma süresi uzadığında düşük hacimlere bağlı olarak çözünme gerçekleşebileceğinden bu sürenin kısa tutulması gerekmektedir. Aksi takdirde solüsyonun ısıtma hızı düşeceğinden dolayı buz kristali oluşumu riski ortaya çıkacaktır.

Yeni vitrifikasyon tekniklerinin geliştirilmesine baēlı olarak teknikle ilgili yeni sorunlar da ortaya çıkmaktadır. Cryotop yöntemi ile vitrifikasyon sırasında hatalı bir dış kuvvetin uygulanmasına baēlı olarak çatlak kaynaklı hasar adı verilen yeni bir embriyo hasarı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2024). Bu hasar türü, dış kuvvetin bükölme yönü, eğriliēi ve embriyonun pozisyonuyla ilgilidir. Vitrifikasyon sırasında operatörün hatası nedeniyle Cryotop'un ucu büköldüğünde vitrifiye olan solüsyonda çatlaklar oluştuēu bildirilmiştir. Bu çatlaklar zona pellusidanın kırılmasına ve embriyonik hasarlara neden olmaktadır (Wang ve ark., 2024). Sunulan çalışmada cryotop gibi esnek uçlu bir gereç yerine inceltilmiş 0,25 ml'lik payetler kullanıldığından vitrifikasyon sonrası cam gibi kırılma riski oluşmaktadır. İlk denemelerde OPS payetini goblet içerisinde çıkarmaya çalışırken payetin tepesine pensin temasına baēlı olarak payet ucunda kırılmalar oluştuēu gözlenmiştir. Bu sorun şeffaf renkteki OPS payetinin LN içerisinde görölememesinden kaynaklanmaktadır. Görülebilirliēi artırmak amacıyla OPS payetin tepesinin asetat kalemle boyanması tarafımızca önerilmektedir.

Ultra hızlı vitrifikasyon yöntemlerinin hatching oranları açısından klasik payet vitrifikasyonuna göre daha başarılı olduēu göze çarpmaktadır. Klasik payet (6 µl) ile 7 M (%39 v/v) EG+ %18 fikor kullanarak (45±5 sn) vitrifiye edilen embriyolarda, çözöürme sonrası 24. saatinde re-ekspansiyon oranı %77,7, 48. saatinde hatching/hatched oranının %16 olduēu bildirilmiştir (Barceló-Fimbres ve Seidel, 2007). Benzer bir araştırmada 30 sn vitrifiye edilen expanded blastositler çözöürme sonrası 96. saatte %14,07 hatched oranı (kontrol %68,37) göstermiştir (Assumpção ve ark., 2008). Aynı vitrifikasyon medyumunu ile klasik payette (10 µl, 30 sn) vitrifikasyon sonrası %10,5 oranında hatching\hatched belirlenmiştir (Yıldız, 2022). Klasik payet ile 0,3 M ksiloz + %3 PEG + %20 gliserol + %20 EG kullanılarak (1 dk) vitrifiye edilen embriyolarda %70,37 re-ekspansiyon, %18,52 oranında hatching görölmüştür (Karasahin, 2019). Sunulan çalışmada MP ile vitrifiye edilen embriyoların çözöürme sonrası 24. saatteki re-ekspansiyon oranı %100 ve hatching\hatched oranı %48 iken 48. saatteki hatching\hatched oranı %60 bulunmuştur. Son vitrifikasyon adımımda kriyoprotektan oranının daha az olması (%30), iki farklı kriyoprotektan kullanılması, embriyoların yoğunluēu düşük

kriyoprotektanda 45 saniye boyunca tutulması ve vitrifiye edilen hacmin oldukça minimal ( $<0,2 \mu\text{l}$ ) olması, sitotoksik hasarın azalmasına ve soğutma-ısıtma hızının artmasına neden olabilir. Bu faktörlerin bir araya gelmesi, sunulan çalışmada klasik payet vitrifikasyonu kullanan araştırmalara kıyasla daha yüksek hatching/hatched oranlarının elde edilmesini sağlamış olabilir.

Vitrifiye edilen embriyoların çözündürme sonrası re-ekspansiyon oranları canlılıkları hakkında önemli fikir vermektedir. Cryotop ile %15 EG+ %15 DMSO kullanılarak 45-60 sn'de vitrifiye edilen 6. gün embriyolar çözündürme sonrası 4. saatte re-ekspansiyon %58,7 olduğu bildirilmiştir (de Oliveira Leme ve ark., 2016). Araştırmacılar vitrifikasyon 1. adım solüsyonu %7,5 EG+ %7,5 DMSO da minimum 9 dk tutulduğunu belirtmişlerdir. Cryotop ile %15 EG+%15 DMSO kullanarak 1 dk dolmadan vitrifiye edilen 7. gün expanded blastosistler, çözündürme sonrasında 24. saatte re-ekspansiyon oranının %81,36 olduğu bildirilmiştir (Martínez-Rodero ve ark., 2024). Sunulan çalışmada 0. ve 24. saat re-ekspansiyon oranlarımız OPS (%64 ve %92) ve MP (%72 ve %100) de araştırmacılardan (de Oliveira Leme ve ark., 2016; Martínez-Rodero ve ark., 2024) yüksek bulunmuştur. Re-ekspansiyonun yüksek bulunmasının nedeni, bu çalışmada embriyoların %7,5 EG+ %7,5 DMSO içeren solüsyona maruz kalma süresinin araştırmacılardan (de Oliveira Leme ve ark., 2016) daha kısa olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sığır IVP embriyolarının KP'lara maruz kalma süresinin uzamasıyla çözündürme sonrası gelişim oranlarının düştüğü ortaya konulmuştur (Özdaş ve ark., 2012). Martínez-Rodero ve ark. (2024)'dan yüksek re-ekspansiyon oranı bulunmasının sebebi embriyoların 45 sn'de vitrifiye edilmesine ve 0,2 M süktroz içeren çözündürme solüsyonunda tek adımda payet içinde çözündürmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Çünkü embriyoların daha az sürede KP'ya maruz kalması toksik etkiyi düşürebileceği bilinmektedir. Bununla birlikte payet içinde çözdürülen embriyoların canlılık oranları, petri içinde çözdürülenlere kıyasla daha yüksek bulunduğu bildirilmektedir (Oliveira ve ark., 2020).

Vitrifiye edilen embriyolarda Rios ve ark. (2010) %27,5, Mezzalira ve ark. (2004) %54, Sanches ve ark. (2013) %63,3 hatching/hatched oranları bildirilmiştir. Bu çalışmalarda vitrifiye edilen embriyolar ile kontrol grubu arasında önemli istatistiki fark olduğu belirtilmiştir. Bazı vitrifikasyon çalışmalarında ise %30,46 (Martínez-Rodero ve ark., 2024), %61,7 (Huang ve ark., 2007), %83,1 (Momozawa ve ark., 2023) vitrifiye edilen gruplarda hatching/hatched oranları bulunmuştur. Bu araştırmalarda kontrol grubu ile vitrifiye edilen grupların istatistiki olarak benzer hatching/hatched oranlarına sahip olduğu görülmektedir. Sunulan çalışmada OPS ve MP ile vitrifiye edilen embriyoların çözündürme sonrası gelişim ve hatching/hatched oranları vitrifiye edilmeyen embriyolara benzer bulunduğu için bazı çalışmaların (Huang ve ark., 2007; Martínez-Rodero ve ark., 2024; Momozawa ve ark., 2023) sonucuna paralel olduğu ve bazı çalışmalardan (Mezzalira ve ark., 2004; Rios ve ark., 2010; Sanches ve ark., 2013) daha başarılı vitrifikasyon sonuçlarına ulaşıldığı düşünülmektedir. Daha önce bildirildiği gibi (Arav ve ark., 2002; Yavin ve Arav, 2007) sunulan çalışmada OPS veya MP'ye bir embriyo yüklenmesi vitrifiye edilecek hacmi düşürerek soğutma-ısıtma hızının artmasına, düşük KP yoğunluğu ise embriyolarda oluşabilecek sitotoksik etkiyi azaltacağından kontrol grubuna benzer hatching oranları elde edilmesine neden olduğu düşünülmektedir. Hücre içine girebilen kriyoprotektan miktarı düşürüldüğünde olası toksik etkinin de azaldığı bildirilmektedir (Széll ve Shelton, 1987). Vitrifiye edilmeyen grupların hatching oranları çalışmalar arasında embriyo kalitesi, embriyoların üretildiği ırk, embriyoların hücrel ve moleküler yeterliliğindeki farklılıkları ortaya koyması açısından faydalı olmaktadır. Marsico ve ark. (2019) genotip, oositin kalitesi ve foliküler mikro ortamı, *in vitro* üretim koşulları, lipidler ve diğer belirleyici moleküller gibi pek çok değişkenin embriyo yeterliliğini bozabileceğini bildirmiştir. Bununla birlikte embriyonun morfofonksiyonel, hücrel ve moleküler yeterliliği, embriyonun gelişimine ve kriyoprezervasyonuna olumlu veya olumsuz etki gösterebilmektedir (Marsico ve ark., 2019). Çalışmalarda hatching oranları embriyo ile ilgili birçok faktör tarafından etkilendiği için vitrifikasyon tekniğinin başarısını kıyaslamada araştırmaları birbiriyle karşılaştırmayı güçleştirmektedir. Bu nedenle vitrifikasyon sonrası hatching oranlarının kontrol grupları ile karşılaştırılması daha sağlıklı bir yaklaşım olacaktır.

Kontrol gruplarına benzer hatching oranları minimal hasarla embriyo dondurulabilirliğinin önemli bir göstergesi olduğu düşünülmektedir.

Vitrifikasyon işlemleri genellikle oda sıcaklığında yapılmaktadır. Cryotop ile %16,5 EG ve %16,5 DMSO (20-25 sn) kullanılarak 37°C’de vitrifiye edilen embriyolar çözündürme sonrası 24. ve 48. saatte hatching oranları %17,1 ve %30,9 olduğu bildirilmiştir (Salzano ve ark., 2014). Benzer şekilde %15 EG+ %15 DMSO kullanılarak (1 dk) 38,5°C’de OPS ile vitrifiye edilen ekspanded embriyolar çözündürme sonrası 48. saatte hatching oranı %28,2 olduğu bildirilmiştir (Souza ve ark., 2018). Araştırmacılar vitrifiye edilmeyen embriyoların 48. saat hatching oranının %87,2 olduğunu ve vitrifikasyon grubundan önemli derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Sunulan araştırmada OPS ve MP yöntemleri, araştırmacıların (Salzano ve ark., 2014; Souza ve ark., 2018) vitrifikasyon aşamalarına benzer olmasına karşın bu araştırmacılar daha yüksek hatching oranları bulunmuştur. Bunun nedeninin vitrifikasyon işlemlerini oda sıcaklığında uygulandığı için embriyoların yüksek sıcaklıklarda (37°C ve 38,5°C) KP’nın artan toksik etkisine maruz kalmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kriyoprotektanlar, oda ısısından yüksek sıcaklıklarda embriyolar için daha toksik etkili olabilmektedir (Gordon 2003; Hasler 2002). Benzer şekilde düşük sıcaklıkların yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan toksisitesine karşı koruma sağladığı bilinmektedir (Wolk, 2010).

Sığırlarda 7. gün ekspanded blastositlerin taze veya kriyoprezerve olmalarına bakılmaksızın transfer sonrası yüksek gebelik oranları verdiği bildirilmektedir (Marsico ve ark., 2019). Ekspanded aşamasına 7. günde oluşan embriyoların diğer aşamadaki embriyolara göre daha yüksek gelişim yeterliliğine sahip olduğu düşünülmektedir (Marsico ve ark., 2019; Pero ve ark., 2018). Vitrifiye edilen ekspanded blastositlerin çözündürme sonrası 48. saatteki hatching/hatched oranları %59,9 (Caamaño ve ark., 2015), %78,1 (Punyawai ve ark., 2015), %82 (Valente ve ark., 2024), %85,9 (Dos Santos ve ark., 2023), %89 (Nunes ve ark., 2024), %93,2 (Inaba ve ark., 2011) olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte vitrifiye edilen 6. ve 7. gün embriyolar (morula, erken blastosist ve blastosist) çözündürüldükten sonra 48. saatteki hatching oranı %77,3 olduğu bildirilmiştir

(Vargas Reyes ve Chacón Jaramillo, 2016). Vitrifiye edilen 7. gün blastosist ve ekspanded blastosistlerin çözdürüldükten sonra 48. saatteki hatching oranı %74 oranında olduğu bildirilmiştir (Oliveira ve ark., 2020). Sunulan çalışmada çoğunluğu blastosist ve ekspanded blastosistlerden oluşan 1. kalitede 7. ve 8. gün embriyoların 48. saat hatching/hatched oranları, OPS'de %36 ve MP'de %60 bulunmuştur. Yukarıda ekspanded blastosistleri vitrifiye eden araştırmacıların oranından düşük bulunmasının nedeni sunulan çalışmada sadece ekspanded blastosistlerin kullanılmadığından kaynaklı olabilir. Diğer araştırmacılardan (Oliveira ve ark., 2020; Vargas Reyes ve Chacón Jaramillo, 2016) düşük bulunmasının nedeni ise bu çalışmada 7. ve 8. gün embriyoların kullanılmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. *İn vitro* üretilen 8. gün blastosistlerin toplam hücre sayısı ve iç hücre kütlesi sayıları, 6. ve 7. gün blastosistlere göre önemli derecede düşük bulunmuştur (Van Soom ve ark., 1997). Vitrifiye edilen 7. gün embriyoların çözdürme sonrası hatching oranları, 8. gün embriyolarına göre daha yüksektir (Gómez ve ark., 2020; Martínez-Rodero ve ark., 2021). Yukarıdaki tüm araştırmacılar vitrifiye edilmeyen embriyoların hatching oranı vermediği için çok sağlıklı karşılaştırmalar yapmak mümkün olmamaktadır. *İn vitro* kültür ortamında embriyoların gelişim hızı önemli bir kalite göstergesi olmaktadır. Fertilizasyonun 7. gününde ekspanded blastosist aşamasına gelişen embriyolar vitrifikasyon sonrasında da yüksek canlılık ve gelişim yeteneği göstermektedir (Marsico ve ark., 2019). Embriyoların kalite sınıflandırılmasında sadece morfolojik görünümleri değil gelişim hızları da göz önünde bulundurulmalıdır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde teknolojik gelişimlere paralel olarak IVP embriyoların üretim maliyetlerinin giderek azalması hayvancılık alanında daha yaygın kullanımına olanak sağlamaktadır. IVP embriyoların klasik yavaş dondurmayla başarılı bir şekilde saklanamaması saha kullanımını sınırlayan en önemli faktörlerden biridir. Yeni ultra hızlı vitrifikasyon teknikleri bu soruna güncel bir çözüm sunmaktadır. Günümüzde birçok vitrifikasyon gereci üretilip ticari olarak satılmaktadır. Bu gereçler, beşerî sisteme uygun olmakla birlikte hayvancılık alanında kullanım için ekonomik bulunmamaktadır. Araştırmamızdaki modifiye payet sistemi bu gereçlere ve kontrol grubuna benzer başarı oranı sağlarken çok daha uygun maliyeti ile sığır embriyolarının vitrifikasyonu için uygun bir çözüm olma potansiyeline sahiptir. Bu MP gerecinin payet içinde çözdürmeye uygun olması gelişmiş laboratuvar imkânlarına ihtiyaç duymadan saha şartlarında kullanılabilirliğini artırmaktadır.

-MP gereci OPS'e göre yüzdesel olarak yüksek hatching sonuçları vermesine rağmen çalışmadaki embriyo sayısının düşüklüğüne bağlı olarak bu fark istatistiksel olarak ispatlanamamıştır. Gelecek çalışmalarda daha yüksek sayıda embriyo kullanılarak bu tekniğin başarısına dair daha kapsamlı çalışmaların yapılması gereklidir. Ayrıca vitrifikasyon sonrası embriyoların transfer edilerek gebelik oranlarının değerlendirilmesi gerçek başarıyı ortaya koyacaktır.

-MP tekniğinin uygulaması OPS'e göre zor olduğu için belli bir el becerisi kazanıldıktan sonra kullanılması uygun olacaktır.

-Sahada vitrifiye embriyoların yaygınlaşması için karmaşık işlemler gerektirmeyen başarılı bir vitrifikasyon tekniğinin geliştirilmesi gereklidir.

## KAYNAKLAR

**Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H (2002).** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev.*, **61**, 57-66.

**Agca Y, Monson RL, Northey DL, Mazni OA, Schaefer DM, Rutledge JJ (1998).** Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*, **50(1)**, 147-162.

**Almiñana C, Cuello C (2015).** What is new in the cryopreservation of embryos? *Anim Reprod.*, **12(3)**, 418-427.

**Annes K, Müller DB, Vilela JAP, Valente RS, Caetano DP, Cibin FWS, Milazzotto MP, Mesquita FS, Belaz KRA, Eberlin MN, Sudano MJ (2018).** Influence of follicle size on bovine oocyte lipid composition, follicular metabolic and stress markers, embryo development and blastocyst lipid content. *Reprod Fertil Dev.*, **31(3)**, 462-472.

**Anonim (2022).** Bovine IVF Protocol. <https://ivfbioscience.com/bovine-media/>. Erişim tarihi: 20.02.22.

**Anonim (2024a).** <https://www.cryotechlab.com/sitio/wp-content/uploads/2020/03/NEW-Cryotec-Method-Protocol-English.pdf>. Erişme tarihi: 29.03.2024.

**Anonim(2024b).**[https://www.irvinesci.com/media/IrvineScientific/Resources/0/0/005483\\_vitrification\\_brochure.pdf](https://www.irvinesci.com/media/IrvineScientific/Resources/0/0/005483_vitrification_brochure.pdf). Erişme tarihi: 29.03.2024.

**Anonim (2024c).** <https://www.scribd.com/document/229931776/Vitrification-Manual>. Erişme tarihi: 30.03.2024.

**Anonim (2024d).** <https://animal.ifas.ufl.edu/media/animalifasufledu/hansen-lab-website/lab-protocols/Laboratory-Guide-for-Production-of-Bovine-Embryos-In-Vitro-ver-06.28.2023.pdf>. Erişme tarihi: 4.10.24.

**Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H (2002).** New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol.*, **187(1-2)**, 77-81.

**Assumpção MEOA, Milazzotto MP, Simões R, Nicacio AC, Mendes CM, Mello MRB, Visintin JA (2008).** In vitro survival of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. *Anim Reprod.*, **5(3-4)**, 116-120.

**Báez F, Camargo Á, Reyes AL, Márquez A, Paula-Lopes F, Viñoles C (2019).** Time-dependent effects of heat shock on the zona pellucida ultrastructure and in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Reprod Biol.*, **19(2)**, 195-203.

**Banliat C, Mahé C, Lavigne R, Com E, Pineau C, Labas V, Guyonnet B, Mermillod P, Saint-Dizier M (2022).** The proteomic analysis of bovine embryos developed in vivo or in vitro reveals the contribution of the maternal environment to early embryo. *BMC genom.*, **23**, 1-21.

**Barceló-Fimbres M, Seidel Jr GE (2007).** Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Mol Reprod Dev.*, **74(11)**, 1395-1405.

**Biçici E (2022).** *Sığırlarda in vitro maturasyon ortamına ilave edilen putresinin embriyo gelişimi ve kalitesine etkisi.* Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

**Blondin P (2015).** Status of embryo production in the world. *Anim Reprod.*, **12(3)**, 356-358.

**Bodu M, Ozturk AE, Elcin M, Atay YE, Narlicay S, Ataman MB, Bucak MN (2024).** Effect of Ergothioneine and Quercetin Additions in to the In Vitro Embryo Development. *Eurasian J Vet Sci.*, **40(2)**, 58-65.

**Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenheede JMM, de Kruif A (1996).** Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, **45(5)**, 1001-1014.

**Bondioli K (2014).** *Cryopreservation of bovine embryos.* In: Hopper RM (Ed), Bovine reproduction. John Wiley Sons Inc., p: 718-722.

**Brevini TAL, Vassena R, Francisci C, Gandolfi F (2005).** Role of Adenosine Triphosphate, Active Mitochondria, and Microtubules in the Acquisition of Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Pig Oocytes. *Biol Reprod.*, **72(5)**, 1218–1223.

**Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G, Buff S (2012).** Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*, **78(6)**, 1294-1302.

**Caamaño JN, Gómez E, Trigo B, Muñoz M, Carrocera S, Martín D, Díez C (2015).** Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos, after a one-step warming/in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology*, **83(5)**, 881-890.

**Campos-Chillon LF, Walker DJ, de la Torre-Sanchez JF, Seidel GE (2006).** In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology*, **65(6)**, 1200–1214.

**Cetin Y, Bastan A (2006).** Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. *Anim Reprod Sci.*, **92(1-2)**, 29-36.

**Cho SK, Cho SG, Bae IH, Park CS, Kong IK (2002).** Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim Reprod Sci.*, **73**, 151-158.

**de Camargo J, Rodrigues R, Valente RS, Muller DB, Vireque AA, Belaz KRA, Bohrer RC, Basso AC, Eberlin MN, Fontes PK, Nogueira MFG, Sudano MJ (2022).** Evaluation of a serum-free culture medium for the enhanced vitrification cryosurvival of bovine in vitro-derived embryos. *Livest Sci.*, **260**, 104922.

**de Oliveira Leme L, Dufort I, Spricigo JFW, Braga TF, Sirard MA, Franco MM, Dode MAN (2016).** Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, **85(4)**, 724-733.

**de Souza DK, Salles LP, Rosa e Silva AAM (2015).** Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. *Braz J Med Biol Res.*, **48(3)**, 191-197.

**Dhali A, Kolte AP, Mishra A, Roy SC, Bhatta R (2019).** *Cryopreservation of Oocytes and Embryos: Current Status and Opportunities*. In: Sheriff DS (Ed), Infertility, assisted reproductive technologies and hormone assays. IntechOpen Publishing, p: 49-64.

**Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X (2000).** High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.*, **63(2)**, 513-518.

**Do VH, Catt S, Amaya G, Batsiokis M, Walton S, Taylor-Robinson AW (2018).** Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified in vitro-derived embryos are transferred into recipients. *Theriogenology*, **120**, 105-110.

**Do VH, Taylor-Robinson AW (2020).** Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos by vitrification: In pursuit of a simplified, standardized procedure that improves pregnancy rates to promote cattle industry use. *Biotechnol Anim Husb.*, **36(3)**, 251-270.

**Do VH, Walton S, Catt S, Taylor-Robinson AW (2016).** Requirements for Cryopreservation of In Vitro-Produced Bovine Embryos by a Standard Method of Vitrification. *J Vet Sci Anim Husb.*, **4(1)**, 1-8.

**Dochi O, Imai K, Takakura H (1995).** Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Anim Reprod Sci.*, **38(3)**, 179-185.

**Dos Santos AC, Joaquim DC, Nociti RP, Macabelli CH, Sampaio RV, Oliveira AS, Pita MO, de Oliveira RAM, da Silveira JC, Meirelles FV, Watanabe OY, Watanabe YF, Chiaratti MR (2023).** Micro-vibration results in vitro-derived bovine blastocysts with greater cryotolerance, epigenetic abnormalities, and a massive transcriptional change. *Theriogenology*, **196**, 214-226.

**Dos Santos EC, Varchetta R, De Lima CB, Ispada J, Martinho HS, Fontes PK, Nogueira MFG, Gasparrini B, Milazzotto MP (2019).** The effects of crocetin supplementation on the blastocyst outcome, transcriptomic and metabolic profile of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, **123**, 30-36.

**Driver AM, Peñagaricano F, Huang W, Ahmad KR, Hackbart KS, Wiltbank MC, Khatib H (2012).** RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *BMC genom.*, **13**, 1-9.

**D'Souza F, Uppangala S, Asampille G, Salian SR, Kalthur G, Talevi R, Atreya HS, Adiga SK (2018).** Spent embryo culture medium metabolites are related to the in vitro attachment ability of blastocysts. *Sci Rep.*, **8(1)**, 17025.

**Ealy AD, Wooldridge LK, McCoski SR (2019).** BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *J Anim Sci.*, **97(6)**, 2555-2568.

**Estudillo E, Jiménez A, Bustamante-Nieves PE, Palacios-Reyes C, Velasco I, López-Ornelas A (2021).** Cryopreservation of gametes and embryos and their molecular changes. *Int J Mol Sci.*, **22(19)**, 10864.

**Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP (2001).** Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev.*, **58**, 186-195.

**Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ (2020a).** Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, **14(5)**, 991-1004.

**Ferré LB, Kjelland ME, Taiyeb AM, Campos-Chillon F, Ross PJ (2020b).** Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reprod Domest Anim.*, **55(6)**, 659-676.

**Fukui Y (1990).** Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev.*, **26(1)**, 40-46.

**Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, Held E, Dufort I, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D (2012).** Molecular mechanisms

and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. *Biol Reprod.*, **87**(4), 1-13.

**Gómez E, Carrocera S, Martín D, Pérez-Jánez JJ, Prendes J, Prendes JM, Vázquez A, Murillo A, Gimeno I, Muñoz M (2020).** Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology*, **146**, 39-47.

**Gómez E, Murillo A, Carrocera S, Pérez-Jánez JJ, Benedito JL, Martín-González D, Gimeno I (2022).** Fitness of calves born from in vitro-produced fresh and cryopreserved embryos. *Front Vet Sci.*, **9**, 1-18.

**Gordon I (2003).** *Laboratory production of cattle embryos*. Vol. 27, 2nd Edition, CABI Publishing, p: 112-302.

**Gutnisky C, Alvarez GM, Cetica PD, Dalvit GC (2013).** Evaluation of the Cryotech Vitrification Kit for bovine embryos. *Cryobiology*, **67**(3), 391-393.

**Güler Ş (2018).** *Farklı vitrifikasyon yöntemleri ile dondurulan sığır oositlerinin çözündürme sonrası in vitro maturasyon başarıları*. Yüksek Lisans Tezi, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur.

**Güler Ş, Yıldız M, Çetin Y (2021).** Direkt Embriyo Transferi: Azot Tankından Uterusa. *Van Vet J.*, **32**(2), 69-73.

**Hasler JF (2002).** The freezing, thawing and transfer of cattle embryos. In: *Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction*, CRC Press, Boca Raton, pp: 119–130.

**Hayashi T, Ueda S, Mori M, Baba T, Abe T, Iwata H (2018).** Influence of resveratrol pretreatment on thawed bovine embryo quality and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology*, **106**, 271-278.

**Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K (2004).** Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod.*, **19**(12), 2884-2888.

**Hoelker M, Schmoll F, Schneider H, Rings F, Gilles M, Tesfaye D, Jennen D, Tholen E, Griesse J, Schellander K (2006).** Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell counts, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. *Reprod Fertil Dev.*, **18**(5), 551-557.

**Holm P, Booth PJ, Callesen H (2002).** Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction*, **123**, 553-565.

**Huang JYJ, Chung JT, Tan SL, Chian RC (2007).** High survival and hatching rates following vitrification of embryos at blastocyst stage: a bovine model study. *Reprod Biomed Online.*, **14**(4), 464-470.

**Hurt AE, Landim-Alvarenga F, Seidel GE, Squires EL (2000).** Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*, **54** (1), 119–128.

**Inaba Y, Aikawa Y, Hirai T, Hashiyada Y, Yamanouchi T, Misumi K, Ohtake M, Somfai T, Kobayashi S, Saito N, Matoba S, Konishi K, Imai K (2011).** In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. *J Reprod Dev.*, **57**(4), 437-443.

**Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J (2017).** Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res.*, **6**(1), 12-18.

**Jones AL (2021).** *Cryopreservation of bovine embryos.* In: Hopper RM (Ed), Bovine Reproduction. John Wiley Sons Inc., p: 1103-1109.

**Jung S, Sul H, Oh D, Jung YG, Lee J, Hyun SH (2024).** Slow freezing cryopreservation of Korean bovine blastocysts with an additional sucrose pre-equilibration step. *Front Vet Sci.*, **11**, 1-9.

**Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T (2009).** Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril.*, **91**(5), 2087–2094.

**Kagalwala S, Gandhi G, Allahbadia G, Kuwayama M, Allahbadia A, Chipkar V, Khatoon A, Ramani R, Madne M, Alsule S (2013).** A comparison of two different vitrification methods for cryopreservation of mature human oocytes. *Survival*, **20**(40), 60.

**Kamoshita M, Sugita H, Kageyama A, Kawata Y, Ito J, Kashiwazaki N (2024).** Recent advances of oocyte/embryo vitrification in mammals from rodents and large animals. *Anim Sci J.*, **95**(1), e13931.

**Karasahin T (2019).** The effect of oleic and linoleic acid addition to the culture media on bovine embryonic development following vitrification. *Pol J Vet Sci.*, **22**(4), 661-666.

**Khatun H, Ihara Y, Takakura K, Egashira J, Wada Y, Konno T, Tatemoto H, Yamanaka K (2019).** Role of endoplasmic reticulum stress on developmental competency and cryo-tolerance in bovine embryos. *Theriogenology*, **142**, 131-137.

**Khurana NK, Niemann H (2000).** Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod.*, **62**, 847-856.

**Kim YM, Uhm SJ, Gupta MK, Yang JS, Lim JG, Das ZC, Heo YT, Chung HJ, Kong IK, Kim NH, Lee HT, Ko DH (2012).** Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. *Theriogenology*, **78(5)**, 1085-1093.

**Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H (1994).** Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *Reproduction*, **100**, 439-446.

**Kong IK, Lee SI, Cho SG, Cho SK, Park CS (2000).** Comparison of open pulled straw (ops) vs glass micropipette (gmp) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*, **53(9)**, 1817-1826.

**Kumar S, Chaves MS, Silva AFB, Vale WG, Negreiros NAB, Arcce IML, Melo LM, de Figueirêdo Freitas VJ (2022).** Factors affecting the cryopreservation of oocytes and embryos in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. *Res Soc Dev.*, **11(4)**, 1-12.

**Kuwayama M (2007).** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, **67(1)**, 73-80.

**Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O (2005).** Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online.*, **11(5)**, 608-614.

**Lane M, Forest KT, Lyons EA, Bavister BD (1999).** Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. *Theriogenology*, **51(1)**, 167.

**Leibo SP (2008).** Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, **69(1)**, 37-47.

**Li S, Winuthayanon W (2017).** Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J Endocrinol.*, **232(1)**, R1-R26.

**Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans ACO (2006).** Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, **65**, 137-152.

**Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP (2003).** Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, **126(3)**, 337-346.

**Lopez E, Cipri K, Naso V (2012).** *Technologies for cryopreservation: Overview and innovation*. In: Katkov I (Ed), *Current Frontiers in Cryobiology*. INTECH Open Access Publisher, p: 527-546.

**Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A (1994).** Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, **42(8)**, 1389–1397.

**Malik AA, Sofi KA, Khatun A, Yousuf N (2022).** Recent advancements in vitrification cryodevices for gamete and gonadal tissue. *CryoLetters*, **43(3)**, 129-139.

**Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE (2016).** Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*, **86(7)**, 1637-1644.

**Marsico TV, Camargo JD, Valente RS, Sudano MJ (2019).** Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. *Anim Reprod.*, **16(3)**, 423-439.

**Martínez-Rodero I, García-Martínez T, Ordóñez-León EA, Vendrell-Flotats M, Olegario Hidalgo C, Esmoris J, Mendibil X, Azcarate S, López-Béjar M, Yeste M, Mogas T (2021).** A shorter equilibration period improves post-warming outcomes after vitrification and in straw dilution of in vitro-produced bovine embryos. *Biology*, **10(2)**, 142.

**Martínez-Rodero I, Salas-Huetos A, Diaz-Muñoz J, Ordóñez-León EA, García-Martínez T, Yeste M, Hidalgo CO, Mogas T (2024).** Blastocoel fluid aspiration improves vitrification outcomes and produces similar sexing results of in vitro-produced cattle embryos compared to microblade biopsy. *Theriogenology*, **218**, 142-152.

**Massip A (2001).** Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. *Reprod Dom Anim.*, **36**, 49-55.

**Mayes M (2002).** *The meiotic arrest of bovine oocytes*. PhD Thesis, University of Laval, Canada.

**Mebratu B, Fesseha H, Goa E (2020).** Embryo transfer in cattle production and its principle and applications. *Int J Phar Biomed Res.*, **7(1)**, 40-54.

**Merton JS, Ask B, Onkundi DC, Mullaart E, Colenbrander B, Nielen M (2009).** Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–in vitro production embryo-production program. *Theriogenology*, **72(7)**, 885-893.

**Mezzalira A, Mezzalira JC, Moraes AN, Thaler Neto A, Vieira AD, Barreta MH, Damiani J (2004).** Vitrification of bovine IVP embryos: Age of embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. *Arch Vet Sci.*, **9(2)**, 107-111.

**Mogas T, García-Martínez T, Martínez-Rodero I (2024).** Methodological approaches in vitrification: Enhancing viability of bovine oocytes and in vitro-produced embryos. *Reprod Domest Anim.*, **59(3)**, 1-17.

**Momozawa K, Fukuda Y (2006).** Vitrification of bovine blastocysts on a membrane filter absorbing extracellular vitrification solution. *J Mamm Ova Res.*, **23**, 63-66.

**Momozawa K, Matsuzawa A, Tokunaga Y, Abe S, Koyanagi Y, Kurita M, Nakano M, Miyake T (2017).** Efficient vitrification of mouse embryos using the Kitasato Vitrification System as a novel vitrification device. *Reprod Biol Endocrinol.*, **15**(29), 1-9.

**Momozawa K, Matsuzawa A, Tokunaga Y, Ohi N, Harada M (2019).** A new vitrification device that absorbs excess vitrification solution adaptable to a closed system for the cryopreservation of mouse embryos. *Cryobiology*, **88**, 9-14.

**Momozawa K, Todoroki K, Nagano M (2023).** A recently developed minimum volume, absorbent, vitrification device, the Kitasato Vitrification System gives excellent outcomes for in vitro produced bovine blastocysts. *Cryobiology*, **113**, 1-6.

**Moussa M, Shu J, Zhang X, Zeng F (2014).** Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Sci China Life Sci.*, **57**(9), 903–914.

**Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH (2006).** Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, **65**(8), 1551-1562.

**Najafzadeh V, Secher JBM, Pihl M, Aerenlund A, Jørgensen N, Jensen KK, Jensen MT, Fenner MF, Strøbech L, Hyttel P (2021).** Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine in vitro produced blastocysts. *Theriogenology*, **171**, 44-54.

**Nunes VRR, Gregianini JTF, Gregianini HAG, Fantin BS, Loureiro B, Satrapa RA (2024).** Comparison between vitrification and slow freezing on the post-thaw development of bovine embryos produced in vitro. *Semina: Ciênc Agrár Londrina.*, **45**(2), 537-554.

**Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomogane H (1997).** Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro-derived bovine blastocysts. *Anim Reprod Sci.*, **48**(1), 27–36.

**Oliveira CS, da Silva Feuchard VL, de Freitas C, da Silva Rosa PM, dos Reis Camargo AJ, Saraiva NZ (2020).** In-straw warming protocol improves survival of vitrified embryos and allows direct transfer in cattle. *Cryobiology*, **97**, 222-225.

**Ozkavukcu S, Erdemli E (2002).** Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *J Ank Med Sch.*, **24**(4), 187-196.

**Özatic O (2011).** *IVF laboratuvarı ve uygulamaları*. 1. Baskı, Abacılar Ofset Matbaacılık, s:134, Isparta.

**Özdaş ÖB, Cirit Ü, Demir K, Bacınoğlu S, Baran A, Pabuccuoğlu S, İrez T, Alkan S, Kemal AK (2012).** İn vitro elde edilen sığır embriyolarının dondurulmasında vitrifikasyon medyumuna maruz kalma sürelerinin çözünme sonrası gelişim üzerine etkisi. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg.*, **38(1)**, 29-35.

**Park J, Bang S, Lee W, Song K, Park M, Chung J, Saadeldin IM, Lee S, Yi J, Cho J (2024).** Sex ratio and conception rates of fresh/vitrified embryos at different developmental stages by ovum pick up in Hanwoo cows. *J Anim Sci Technol.*, **66(5)**, 920.

**Pedro PB, Zhu SE, Makino N, Sakurai T, Edashige K, Kasai M (1997).** Effects of Hypotonic Stress on the Survival of Mouse Oocytes and Embryos at Various Stages. *Cryobiology*, **35(2)**, 150–158.

**Pero ME, Zullo G, Esposito L, Iannuzzi A, Lombardi P, De Canditiis C, Neglia G, Gasparrini B (2018).** Inhibition of apoptosis by caspase inhibitor Z-VAD-FMK improves cryotolerance of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*, **108**, 127-135.

**Perry G (2015).** Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*, **33**, 14-26.

**Pioltine EM, Costa CB, Franchi FF, Dos Santos PH, Nogueira MFG (2023).** Tauroursodeoxycholic Acid Supplementation in In Vitro Culture of Indicine Bovine Embryos: Molecular and Cellular Effects on the In Vitro Cryotolerance. *Int J Mol Sci.*, **24(18)**, 1-15.

**Plante L, King WA (1994).** Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. *J Assist Reprod Genet.*, **11(10)**, 515-529.

**Punyawai K, Anakkul N, Srirattana K, Aikawa Y, Sangsritavong S, Nagai T, Imai K, Parnpai R (2015).** Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. *J Reprod Dev.*, **61(5)**, 431-437.

**Rall WF (1987).** Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, **24(5)**, 387–402.

**Rall WF, Fahy GM (1985).** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 °C by vitrification. *Nature*, **313**, 573–575.

**Rall WF, Meyer TK (1989).** Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*, **31(3)**, 683–692.

**Ramos-Ibeas P, Heras S, Gómez-Redondo I, Planells B, Fernández-González R, Pericuesta E, Laguna-Barraza R, Pérez-Cerezales S, Gutiérrez-Adán A (2019).** Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev.*, **86(10)**, 1292-1306.

**Reinders JMC, Wurth YA, Kruip TAM (1995).** From embryo to calf after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, **43(1)**, 306.

**Rhodes-Long KA (2020).** *Lipid quantification and cryopreservation of in vitro produced Jersey cattle embryos*. Master Thesis, the Faculty of California Polytechnic State University, San Luis Obispo.

**Ribeiro JC, Carrageta DF, Bernardino RL, Alves MG, Oliveira PF (2022).** Aquaporins and animal gamete cryopreservation: Advances and future challenges. *Animals*, **12(3)**, 359.

**Rios GL, Mucci NC, Kaiser GG, Alberio RH (2010).** Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci.*, **118(1)**, 19-24.

**Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, De la Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A (2008).** Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim.*, **43**, 44-50.

**Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002).** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev.*, **61**, 234-248.

**Saki G, Ghalambor Dezfuly F (2005).** Vitrification of human oocyte using cryoloop. *Iran J Reprod Med.*, **3(1)**, 19-24.

**Salilew-Wondim D, Saeed-Zidane M, Hoelker M, Gebremedhn S, Poirier M, Pandey HO, Tholen E, Neuhoff C, Held E, Besenfelder U, Havlicek V, Rings F, Fournier E, Gagné D, Sirard MA, Robert C, Gad A, Schellander K, Tesfaye D (2018).** Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts derived from in vivo embryos subjected to in vitro culture before, during or after embryonic genome activation. *BMC Genom.*, **19**, 1-19.

**Salzano A, Alberio G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, Zicarelli L, Gasparrini B (2014).** Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Anim Reprod Sci.*, **151(3-4)**, 91-96.

**Sanches BV, Lunardelli PA, Tannura JH, Cardoso BL, Colombo MH, Gaitkoski D, Basso AC, Arnold DR, Seneda MM (2016).** A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*, **85(6)**, 1147-1151.

**Sanches BV, Marinho LSR, Filho BDO, Pontes JHF, Basso AC, Meirinhos MLG, Silva-Santos KC, Ferreira CR, Seneda MM (2013).** Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, **80**(4), 372–377.

**Sanches BV, Zangirolamo AF, da Silva NC, Morotti F, Seneda MM (2017).** Cryopreservation of in vitro-produced embryos: challenges for commercial implementation. *Anim Reprod.*, **14**(3), 521-527.

**Santos P, Chaveiro A, Simões N, Moreira da Silva F (2008).** Bovine oocyte quality in relation to ultrastructural characteristics of zona pellucida, polyspermic penetration and developmental competence. *Reprod Domest Anim.*, **43**, 685-689.

**Saragusty J, Arav A (2011).** Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, **141**(1), 1-19.

**Sarı A (2024).** *İn vitro* koşullarda elde edilen sığır embriyolarının antifreeze protein III ile dondurulması ve çözüm sonrası değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

**Sata R, Tsujii H, Abe H, Yamashita S, Hoshi H (1999).** Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *J Reprod Dev.*, **45**(1), 97-103.

**Satılmış F (2019).** *Farklı antioksidanların (pentoksifilin ve borik asit) in vitro sığır embriyo kültür medyumlarına ilavesinin embriyo gelişimi ve kalitesi üzerine etkileri.* Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

**Satılmış M, Akyol N, Kızıl SH, Bucak MN, Karaşahin T (2014).** Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan in vitro üretilmiş sığır embriyolarının payet içinde devitrifikasyonunun embriyo canlılığı üzerine etkisinin araştırılması. *bdhad.*, **1**(1-2), 13-17.

**Sharma R, Kumar B, Biswas N, Reddy AL (2024).** Assisted reproductive techniques (ART) and their application in large ruminants. *Int J Vet Sci Anim Husb.*, **9**(4), 410-415.

**Souza JF, Lienou LL, Rodrigues APR, Alexandrino E, Cavalcante TV, Santos RR, Figueiredo JR, Dias FEF (2018).** Cryosurvival after exposure of IVF-derived Nellore embryos to different cryoprotectants and exposure times during vitrification. *Cryobiology*, **84**, 95-97.

**Speckhart SL, Wooldridge LK, Ealy AD (2023).** An updated protocol for in vitro bovine embryo production. *STAR protoc.*, **4**(1), 101924.

**Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Magalhães LCO, Crocomo LF, de Lima-Neto JF, da Cruz Landim-Alvarenga F (2011).** Lipid content and

apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, **75**, 1211-1220.

**Sudano MJ, Rascado TDS, Tata A, Belaz KRA, Santos VG, Valente RS, Mesquita FS, Ferreira CR, Araújo JP, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FD (2016).** Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology*, **86(2)**, 472-484.

**Széll A, Shelton JN (1987).** Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on Day-3 mouse embryos. *J Reprod Fert.*, **80**, 309-316.

**Tajimi H, Yamazaki T, Oike S, Yoshida T, Okada K, Kuwayama M, Ushijima H (2018).** Vitrification for bovine embryos with low-quality grade. *Anim Sci J.*, **89(8)**, 1194-1200.

**Takahashi N, Harada M, Oi N, Izumi G, Momozawa K, Matsuzawa A, Tokunaga Y, Hirata T, Fujii T, Osuga Y (2020).** Preclinical validation of the new vitrification device possessing a feature of absorbing excess vitrification solution for the cryopreservation of human embryos. *J Obstet Gynaecol Res.*, **46(2)**, 302-309.

**Truong TT, Gardner DK (2020).** Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification. *Hum Reprod.*, **35(1)**, 12-23.

**Tsang WH, Chow KL (2009).** Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques*, **46(7)**, 550-552.

**TÜİK (2023).** <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=101&locale=tr>. Erişim tarihi: 19.6.2024.

**Ün M, Küplülü Ş (2005).** Mezbahadan toplanan ovaryumlardan elde edilen sığır oositlerinin in vitro maturasyonu ve fertilizasyonu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, **52**, 93-98.

**Vajta G (2000).** Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci.*, **60(61)**, 357-364.

**Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998a).** Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.*, **51(1)**, 53-58.

**Vajta G, Kuwayama M (2006).** Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, **65(1)**, 236-244.

**Vajta G, Kuwayama M, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H (1998b).** Open pulled straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. *Theriogenology*, **49(1)**, 176.

**Valente RS, Marsico TV, Maiollo BAP, Lopes NJ, Tannura JH, Sudano MJ (2024).** Can the addition of Interleukin-13 affect the cryosurvival of bovine embryos?. *Theriogenology*, **215**, 138-143.

**Van Soom A, Mateusen B, Leroy J, De Kruif A (2003).** Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology?. *Reprod Biomed Online.*, **7(6)**, 664-670.

**Van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A (1997).** Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev.*, **47(1)**, 47-56.

**Vargas Reyes JN, Chacón Jaramillo L (2016).** Cryopreservation method and composition of the vitrification solution affect viability of in vitro bovine embryos. *Rev Colomb Cienc Pecu.*, **29(2)**, 130-137.

**VerMilyea M, Brewer A (2017).** Appendix D: Irvine Scientific® vitrification system. In: Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal (Eds), Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1568, p: 317-334.

**Viana J (2019).** 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, **36(4)**.

**Viana J (2023).** 2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, **41(4)**.

**Yavin S, Arav A (2007).** Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, **67(1)**, 81-89.

**Yıldız M (2022).** *İn vitro üretilen sığır embriyolarının kültür medyumuna L-karnitin eklenmesinin embriyo dondurulması üzerine etkisi.* Doktora Tezi, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur.

**Yoshida M, Abe S, Koyanagi Y, Nakano M, Miyake T (2022).** Diamour®, a newly vitrification device for human blastocysts, provides the same efficient perinatal outcomes as the commonly used Cryotop®. *Taiwan J Obstet Gynecol.*, **61(4)**, 590-595.

**Youngs CR (2011).** Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep, and goats. *J Vis Exp.*, **(54)**, 2764.

**Yu XL, Deng W, Liu FJ, Li YH, Li XX, Zhang YL, Zan LS (2010).** Closed pulled straw vitrification of in vitro-produced and in vivo-produced bovine embryos. *Theriogenology*, **73(4)**, 474-479.

**Wang R, Li D, Zhao L, Zhu Q, Sun L, Xue S, Lyu Q (2024).** External bending of cryodevice during vitrification leads to cryoprotectant cracks and damage to embryo blastomeres. *Reprod Biomed Online.*, **48(5)**, 103763.

**Wowk B (2010).** Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*, **60(1)**, 11-22.





