

## KOYUN EMBRİYOSUNUN DONDURULMASI (Derleme)

M. Bozkurt ATAMAN<sup>1</sup>

### Freezing of sheep embryo : A Review

#### SUMMARY

In this review, freezing of the sheep embryo, principles of embryo freezing, culture of embryo and technique of embryo freezing were discussed.

KEY WORDS: Embryo, freezing, sheep

#### ÖZET

Bu derlemede, koyun embriyosunun dondurulması, embriyo dondurma prensipleri, embriyoların kültüre edilmeleri ve dondurma teknikleri hakkında bilgiler sunulmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Embriyo, dondurma, koyun

#### GİRİŞ

Hayvan yetiştiriciliğinde modern teknolojilerden yararlanarak verimi artırmak ve kısa sürede istenen zamanda ve arzu edilen sayıda üstün nitelikli yavrular elde edebilmek için, suni tohumlama, seksüel siklusların kontrolü, ikizlik oranının artırılması, cinsiyet tayini, gebeliğin erken tanısı ve nihayet embriyo nakli ve bununla ilgili olarak embriyonun dondurulması, mikromanipasyonu ve invitro fertilizasyon gibi bir takım yöntemler gittikçe yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. İster hayvan başına verimi artırmak isterse hayvanların mevcut verimlerini koruyup sürekliliğini sağlamak konusunda olsun uygulanan biyoteknolojik yöntemlerin ana amacı erkek ya da dişi genotipinin yaygınlaştırılmasıdır. Bu derlemede de bir biyoteknolojik yöntem olan koyunlarda embriyo dondurma tekniğinden bahsedilecektir.

Embriyo dondurulmasının; taşıyıcı hayvanların embriyo toplama gününde senkronize edilmelerine ve taşıyıcı hayvan seçimi için kalabalık sürülere gerek göstermemesi, sürü idaresi (management) ve yiyecek kaynaklarının en iyi şekilde kullanımı için doğumların istenen zamana ayarlanabilmesi, embriyo naklinden sonra geriye kalan kullanılabilir embriyoların boşa harcanmaması, donmuş embriyoların canlı hayvanların taşınmasına göre çok daha kolay ve ucuz bir şekilde nakledilebilmesi ve embriyoların ithalat ve ihracaatının daha kolay olması, performans ve projeni testlerinin (Projeny Testing) daha hızlı ve etkili bir şekilde yapılabilmesi ve nesli tükenmekte olan ırkların popülasyonlarının arttırabilmesine olanak sağlaması ve bu sürüleri salgın hastalıklardan koruyabilmesi gibi birçok avantajları bulunmaktadır (Schneider ve Mazur 1986).

#### Kriyobiyolojinin Esasları

Canlı hücre ve dokuların dondurulma esasları embriyonun dondurulma ilkelerini de içerir. Embriyolar donma işlemi sırasında hücre içi solüsyon konsantrasyonlarının artması veya buz kristalleri oluşumuyla zarar görebilmektedir. Hızlı dondurma işlemi solüsyon etkilerinden doğan

zararları en aza indirirken buz kristallerinin oluşumunu başlatmakta, buna karşılık yavaş dondurma işlemi buz kristalleri oluşumunu engellerken solüsyon etkilerinden doğan zararları arttırmaktadır.

Derin dondurma işlemleri sırasında iki kritik aşama bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, ısının düşürülmesi sırasında suyun hücre dışına çıkması, diğeri ise hücre dışına çıkan suyun ekstrasellüler olarak büyük buz kristallerini oluşturmasıdır. Diğer taraftan hücre içinde kalan suyun buz kristallerine dönüşmesi hücrenin ölümü ile sonuçlanmaktadır.

-15°C'ye kadar buz kristalleri oluşturmadan yapılan soğutmalarda (supercooling) hücrelerde ölüm şekillenmemekte, ancak aynı ısı derecesinde buz kristallerinin oluşması ise hücrelerde dönüşümü olmayan (irreverzibl) yıkımlara neden olmaktadır.

Embriyonun dondurulması ile ilgili işlemler sırasında dondurma vasatı içerisine kriyoprotektif maddelerin ilave edilmesi gerekmektedir. Ancak bu işlem esnasında hücrenin zarar görmemesi için ısının düşürülmesi yavaş olmalıdır. Isı yavaş olarak düşürüldüğü takdirde hücre içerisinde bulunan su hücre dışına çıkar (Exosmos), hücre içerisinde çözölen maddelerin konsantrasyonu artar ve sonuç olarak intrasellüler donma görülmez. Dondurma işlemi hızlı yapıldığı takdirde ise yeterli miktarda sıvının hücre dışına çıkması engellenerek ekstrasellüler sıvı konsantrasyonunda hızlı bir şekilde artış sağlanır ve hücre dışına çıkamayan su hücre içerisinde buz kristallerinin oluşumuna neden olur.

Dakikada 1°C ya da daha düşük soğutma oranlarında sadece birkaç embriyoda intrasellüler donma sağlanırken, 5°C/dak. veya daha yüksek soğutma oranlarında embriyoların tamamında intrasellüler donma sağlanır.

Yeterli derecede düşük soğutma oranları, embriyoların su kaybetmesi için gerekli zamanı sağlayarak ozmotik dengenin kurulmasını sağlar. Fakat yüksek soğutma oranları suyun hücre dışına çıkmasını önlemekte ve embriyoların intrasellüler olarak donup ölmelerine neden olmaktadır.

Gliserol ve DMSO (Dimetyl Sulfoxide) gibi kriyoprotektant maddelerin dondurma vasatına ilave

edilmesi daha düşük sıcaklıklarda donmayı sağlamakta, ayrıca bu maddelerin ilave edilmesi ile solüsyon etkilerinden ortaya çıkan zararlar ve dehidrasyon gecikmekte veya önlenmektedir. Bu nedenle embriyolar geniş buz kristalleri oluşumunu önlemek için oldukça yavaş olarak dondurulabilir. Ayrıca kriyoprotektant maddeler ortamın ozmolitesini oldukça artırarak toksik etki oluşturabilirler.

Optimal yaşama şansı için gerekli ısı seviyeleri tekrar ısıtma esnasında (rewarming) -70 °C' den -20°C'ye ve soğutma (cooling) esnasında ise -4 °C'den -60 °C'ye kadardır.

Soğuma oranları hücrenin büyüklüğüne, yüzey hacim oranına, su geçirgenliğine ve o geçirgenliğin ısı katsayısına bağlıdır (Leibo 1988, Schneider ve ark. 1974, Whittingham 1980).

#### Embriyo Dondurulmasında Kriyoprotektif Maddelerin Önemi

Embriyoların derin dondurulmalarından sonra canlı kalabilmeleri için mutlak surette kriyoprotektant maddelerin (Dimetyl Sulfoxide, Gliserin, Etilen Glikol vb) vasata ilave edilmeleri gerekir.

Kriyoprotektif maddeler embriyonun bulunduğu vasata ilave edildiklerinde hiperozmotik ortam oluşturarak embriyoda bulunan suyun dışarı

çıkmasını sağlar. Dışarı çıkan su embriyoda büzüşmeye neden olur. Dışarı çıkan suyun yerine kriyoprotektif madde girer.

Kriyoprotektif maddenin embriyo içerisine girişinde rol oynayan faktörler vasatın ısı, konsantrasyonu ve zamandır. Vasatın ısı ve kriyoprotektif madde konsantrasyonunun yüksekliği hücre içine giren madde miktarının artmasına neden olur. Kriyoprotektif madde ile beraber hücre içine giren su miktarında da artış görülür. Kriyoprotektif maddenin vasata ilave edilmesi bir defada ya da 5-30 dak.'lık sürelerle oda ısısında ekilibrasyonlarla olmaktadır.

Gliserinin vasat içerisindeki konsantrasyonu 1.0-2.8 mol/l arasında değişmektedir. Diğer kriyoprotektif maddeler DMSO ve Etilen glikolün konsantrasyonu ise 1.5 mol/l'dir (Schröder 1988).

Tervit ve Goold (1984) yaptıkları bir çalışmada 166 adet geç morula ve blastosist aşamasındaki koyun embriyolarını farklı kriyoprotektantlar kullanarak (DMSO, Etilen Glikol, Gliserol) ampuller içerisinde dondurarak, sulandırma işlemini de azalan konsantrasyonlar veya sukrozun derece derece azalan konsantrasyonları ile yaptıklarını ve tabloda sunulan sonuçları elde ettiklerini bildirmektedirler.

Kriyoprotektant	Metot	Transfer edilen	Donan
DMSO (Dimetil sülfoksid)	ak+	11/26 (42)+++	11/26 (42)
	sd++	15/26 (58)	15/28 (54)
EG (Ethylene glycol)	ak	15/24 (50)	12/29 (41)
	sd	16/25 (64)	16/25 (64)
G (Glycerol)	ak	7/25 (28)	7/31 (23)
	sd	11/26 (42)	1/27 (41)
TOPLAM		72/152 (47)	72/166 (43)

ak : azalan konsantrasyonlar +, sd : sukroz dereceleri ++, yüzde +++

Araştırmacılar (Tervit ve Goold 1984), koyun embriyosunun dondurulmasında Etilen Glikol ve DMSO'nun Gliserol'e göre daha iyi bir kriyoprotektant madde olduğunu ve sukrozun derece derece azalan konsantrasyonlarıyla yapılan sulandırma işlemiyle daha yüksek bir başarı elde edilebileceğini bildirmektedirler.

#### Embriyoların Payetlere Çekilmesi

Embriyoların dondurulması ampuller veya uygulama kolaylığından dolayı payetler içerisinde olmaktadır. Embriyoların payetler içerisine çekilmesi morfolojik muayenelerinden sonra ekilibrasyon sırasında olmaktadır. Embriyoların payetlere çekilmesinde değişik vasatlar kullanılmakla birlikte, embriyoların bulunduğu vasat kriyoprotektant maddeleri de içermektedir.

Koyun embriyosunun dondurulmasında soğutma işlemi 20 ° C'den -7 ° C'ye kadar 1 ° C/dak.'lık bir hızla gerçekleştirilmektedir.

Kristalizasyon -7 ° C'de sun'i olarak başlatılır. Sıvı azot içerisinde soğutulmuş bir pens ya da cam

pipetin payete 1-4 saniye dokundurulması ile seeding olarak adlandırılan kristalizasyonun başlatılması gerçekleştirilir (Fahning ve Garcia 1992).

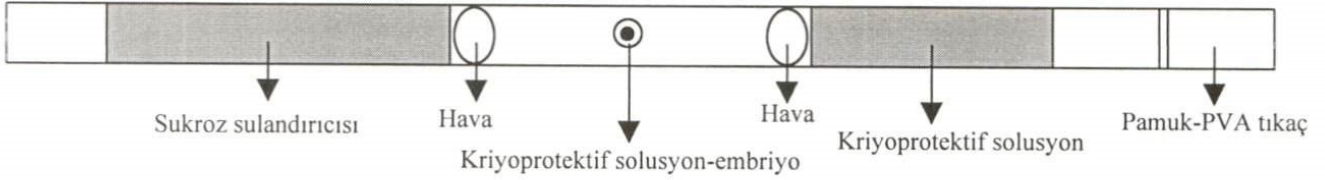
Seeding işlemi takiben 0.3 ° C/dak.'lık bir hızla ısının -30 ila -60 ° C arasına düşmesi sağlanarak bu ısı derecesindeki payetler sıvı azot içerisine daldırılır ve kullanıma kadar burada muhafaza edilirler.

#### Embriyo Dondurma Yöntemleri

##### 1. Konvensiyonel Yöntem

Kontrollü dondurma ve çözme oranları kullanarak yapılan dondurma işlemlerinde embriyoların aşırı derecede soğumasından kaçınmak için yaklaşık -6, -7°C'lik ısı derecelerinde kristalizasyonun oluşturulması gerekmektedir. Bu işlem soğutma aracı, dondurma kabı ve hacmi, kristalizasyon aleti ve sıcaklığı gibi dört adet değişkeni içerir. Kristalizasyonun, dondurma işlemi açısından önemi büyüktür. Çünkü kristalizasyon uygun sıcaklık ve yöntem ile yapılmazsa embriyo kaybı çok fazla olmaktadır.

Aşağıda konvansiyonel yöntemle uygun payet şekli şematik olarak gösterilmiştir.



Konvansiyonel dondurma yöntemi aşağıdaki safhaları ihtiva eder;

1. Oda sıcaklığında 20 dakika süre ile uygun bir kriyoprotektant maddenin ilavesi
2. Embrioların payetler içerisine çekilmesi
3. Dondurma cihazına nakil
4. Kristalizasyonun indüklenmesi (Seeding)
5. Yavaş soğutma (0.3-0.1 °C/dak. oranla -30, -35 °C'ye kadar)

6. -196 °C'deki sıvı azot içerisine nakil ve depolama

7. Embrioların çözündürülmesi

8. Kriyoprotektant maddenin uzaklaştırılması (Niemann 1991).

Schiewe ve ark. (1990) çeşitli kriyoprotektantlar kullanarak konvansiyonel yöntemle koyun embriolarını dondurduklarını ve aşağıda sunulan sonuçları elde ettiklerini bildirmektedirler.

### Çalışma 1

Kriyoprotektant	Transfer Edilen	Gebe Kalan	Doğan
Gliserol	5	1	1
Propilen glikol	5	4	5

### Çalışma 2

Kriyoprotektant	Transfer Edilen	Gebe Kalan	Doğan
Gliserol	7	1	1
Propilen glikol	7	3	5

Niemann (1991) konvansiyonel yöntemle koyun embriolarını dondurmuş ve dondurmadan sonra gelişme aşamasına göre morfolojik yönden sağlam kalan embrioları tespit etmiştir. Araştırmacı morula aşamasında dondurduğu 22 adet embriyodan 11 adedinde, blastosist aşamasında ise 15 embriyodan

14'ünde morfolojik olarak herhangi bir dejenerasyon şekillenmediğini bildirmektedir.

Heyman ve ark. (1987) ise etilen glikol kullanarak konvansiyonel yöntemle koyun embriolarını dondurduklarını ve tabloda sunulan sonuçları elde ettiklerini ifade etmektedirler.

Çözdürülen ve transfer edilen embriyo	72	-
Taşıyıcı koyun	36	-
Gebe koyun	28	77
Doğum yapan koyun	27	75
Doğan kuzu	42	-
Embriyo yaşam kabiliyeti	42	58.3
Kuzu/Gebe taşıyıcı	1.56	-

Sayı (n) Oran (%)

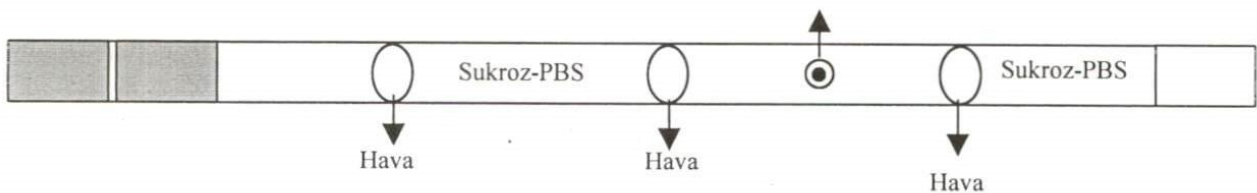
### 2. One-step Yöntemi (Tek Adım Yöntemi)

One-step yöntemi konvansiyonel yöntemin bir modifikasyonudur. Dondurma işleminden sonra embrioların morfolojik yönden değerlendirilmesi ve kriyoprotektant sulandırması bu yöntemde yoktur. Bu yöntemin ilkesi, payet içerisinde donma ve sulandırma ortamını hava kabarcıkları ile ayırmaktır.

Fransız one-step yöntemi normal kültür vasatı, embrioları ihtiva eden dondurma vasatı ve sulandırma vasatından oluşurken Amerikan

Aşağıda one-step yöntemine uygun olarak hazırlanan payet şekli gösterilmiştir.

Gliserol-PBS-Embriyo



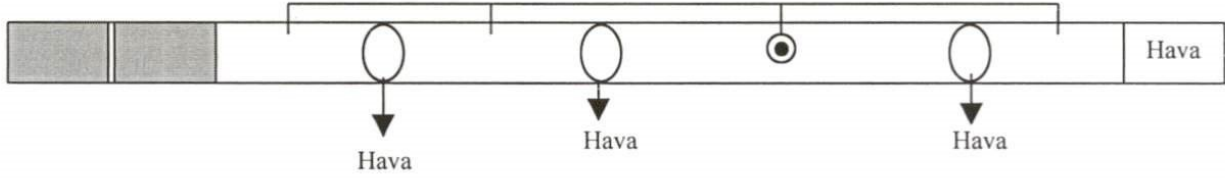
Ware ve Boland (1987) one-step yöntemle koyun embriyosunun dondurulmasında sukrozun düşük gliserol seviyelerinde toksik olduğunu ancak yüksek seviyelerde ise sukrozun 1 M düzeyinde gerekli olduğunu bildirmektedirler.

### 3. Stepwise Yöntemi (İki adımda Soğutma Yöntemi)

Stepwise yönteminde ise soğutma işlemleri iki adımda gerçekleştirilir. Bu yöntemde hayatta kalma, hızlı çözünme kullanılırsa mükemmel, yavaş çözünme kullanılırsa dehidrasyon şekilleneceğinden dolayı düşüktür.

Aşağıda stepwise yöntemine uygun payet şekli şematik olarak gösterilmektedir.

Gliserol-PBS-Embriyo



İki adımda soğutma metodunda şu sıra takip edilmektedir,

1. Embriyoların genital kanaldan toplanması
2. Embriyoların oda ısısında (19-20 °C) kültür içerisinde 3-6 saat bekletilmesi
3. Kriyoprotektant maddenin üç adımda ilavesi
4. Embriyoların (2-5 adet) cam ampul veya payet içerisindeki dondurma medyumuna içerisinde 30-50 dakika süreyle konulması ve ampul ve payetlerin ağızlarının kapanması
5. Embriyoların oda ısısından -6, -7 °C'ye kadar 1°C/dak. hızla soğutulması
6. -6 veya -7°C'deki payet ve ampullerin sıvı azot içerisinde soğutulan pensle kristalizasyonunun başlatılması

Cocero ve ark. (1988) koyun embriyolarını two step yöntemiyle dondurduklarını ve aşağıda belirtilen sonuçları elde ettiklerini bildirmektedirler.

7. Embriyoların -6 °C'den -30 °C'ye kadar 0.3 °C/dak. hızla soğutulması
8. Embriyoların -30 °C'den -33 °C'ye kadar 0.1 °C/dak. hızla soğutulması
9. -33 °C'deki embriyoların direkt olarak -196 °C'deki sıvı azota nakli ve depolanması
10. Çözünme için ampul ve payetlerin 25 °C'deki su banyosuna yerleştirilmesi ve çalkalanması
11. Çözünmeden hemen sonra embriyoların taze kültür vasatına nakledilmesiyle kriyoprotektant maddenin uzaklaştırılması
12. 38 °C'de atmosfer altında 24 saat süreyle PBS+% 20 koyun serumu içinde kültür (Niemann 1991).

Kriyoprotektant	Donmuş	Çözünmeden sonra elde edilen	Çözünmeden 24 saat sonra yaşayan	%
Etilen Glikol	41	40	25	62.5
Gliserol	34	30	7	23.3

Maurer'e göre (1978) Willadsen ve ark. koyun embriyolarını DMSO kullanarak two step yöntemle dondurduklarını ve sırasıyla 62 adet embriyodan 8 adedinin (%13), 24 adet embriyodan ise yine 8 adedinin (% 32) yaşama kabiliyeti gösterdiğini ifade etmektedirler.

### 4. Vitrifikasyon

Dondurma için cihaz kullanmaksızın bir başka hızlı dondurma yaklaşımı da vitrifikasyondur. Vitrifikasyon yüksek oranda konsantre edilmiş kriyoprotektant solüsyonun buz kristalleri oluşturmaksızın soğutma esnasında katılaşmasıyla uygulanan fiziksel işlem olarak tarif edilir. Bu katı madde sıvı halin moleküler ve iyonik dağılımını

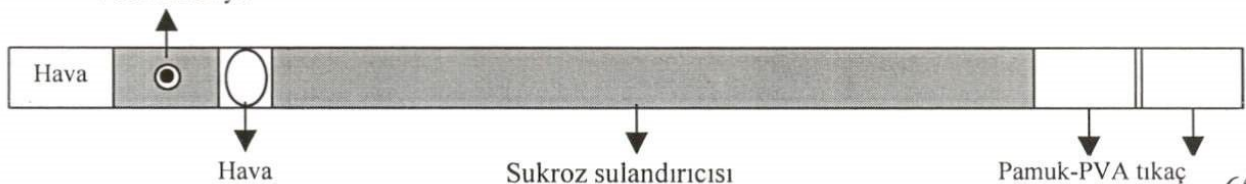
engeller ve cam halini alma veya camlaşma olarak tanımlanır.

### Vitrifikasyon Solüsyonlarının Özellikleri

- a. Solüsyon bir veya daha fazla sayıda nüfuz eden kriyoprotektantların yüksek konsantrasyonlarını ihtiva etmeli
  - b. Her solüsyon mutlaka fizyolojik bir tuz bileşiği içermeli
  - c. Çok hızlı soğutma ve vitrifiye edebilmek için makromoleküller ilave edilmiş olmalıdır (Rall 1992).
- Vitrifikasyon yönteminde ekilibrasyon stepwise yöntemle gerçekleştirilir. Daha düşük konsantrasyona ekilibrasyon yaklaşık 5-10 dakika süreyle 4 °C'de yapılmaktadır.

Aşağıda vitrifikasyon yöntemine uygun payet şekli şematik olarak gösterilmiştir.

VS3a-Embriyo



Başarılı bir vitrifikasyon yönteminde dikkat edilecek noktalar şunlardır.

1. Soğutma, ekilibasyon ve çözünme esnasında buz kristalleri oluşturmamaya dikkat edilmeli
2. Hücrelerin soğutmadan önce yüksek konsantrasyonlu (6M'dan büyük) kriyoprotektantla kontrollü olarak ekilibasyonu ozmotik olarak dehidrasyonun sağlanması
3. Dondurma işlemi esnasında embriyoların ozmotik volümlerinde karakteristik değişikliklerin şekillenmesi (Rall 1992).

Vitrifikasyon yönteminde aşağıdaki sıra takip edilmektedir,

1. Embriyolar BSA ihtiva eden PB1 solusyonu içerisinde yıkanır
- 2.1.6 M. gliserol ve % 6 BSA ihtiva eden PB1 solusyonuna transfer edilerek bu ortam içerisinde oda ısısında 20 dakika süreyle tutulur
3. Embriyolar 4.2 M gliserol de % 6 BSA ihtiva eden PB1 solusyonuna 1 dakika süreyle maruz bırakıldıktan sonra son vitrifikasyon solusyonu (VS3a, 6.5 M gliserol ve % 6 BSA ihtiva eden PB1) içine yerleştirilir.
4. Embriyolar payetler içerisine çekilir ve embriyo, sukroz solusyonu ve VS3a (vitrifikasyon solusyonu) solusyonlarının birbirlerinden hava kabarcıkları vasıtasıyla ayrılmasına dikkat edilir.
5. Embriyolar VS3a solusyonu içine transfer edildikten 1 dakika sonra payetler -170 °C'deki sıvı azot buharına transfer edilerek soğutulur. Soğutma oranı yaklaşık 200 °C/dak.'dır. Tüm süspansiyon -120 °C civarında cam görüntüsünü (vitrifiye) alır.

6. Payetler sıvı azot içerisinde depolanır (Rall 1992).

### 5. Ultra Hızlı Dondurma

Bu yöntem de basit, çabuk ve çok pahalı teçhizat gerektirmeyen bir yöntemdir. Vitrifikasyon yönteminden farkı hücre içi ve hücre dışı suyun kristalizasyonunun şekillenmesidir.

Yapılan ilk çalışmalarda morula ve blastosist aşamasındaki embriyolar payetlendikten sonra ya direkt olarak sıvı azot içerisine çekilmiş ya da 12 °C/dak. oranla -30 °C'ye kadar soğutulmuştur.

Bu yöntemle yapılan dondurma işlemlerinde Gliserol'ün DMSO'dan daha uygun bir kriyoprotektant olduğu fakat hayatta kalma oranının kontrollü dondurma ve çözünme yöntemi ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu bildirilmektedir (Niemann 1991).

Başarılı bir hızlı dondurma işlemi için Gliserol gibi nüfuz eden bir kriyoprotektant ve nüfuz etmeyen bir bileşik (genellikle sukroz kullanılır) gereklidir.

Laktöz ve Glikoz embriyoların hızlı olarak dondurulmasında yararlı olabilmektedir.

Bu yöntemde embriyolar uygun bir vasat ile birlikte direkt olarak payetlere çekilir, payetlerin ağızları ısıtılarak kapatılır ve payetler doğrudan sıvı azot içerisine transfer edilir.

Merry ve ark. (1984) koyun embriyolarını yavaş ve ultra hızlı yöntemle dondurduklarını, sulandırma işlemi ise standart metot ve 0.25 M sukroz kullanarak yaptıklarını ve aşağıda sunulan sonuçları elde ettiklerini bildirmektedirler.

Dondurma-Çözdürme İşlemi	Kriyoprotektant Sulandırma İşlemi	Gelişme skorları (a)					Gelişme Oranları (%)
		0	1	2	3	4	
YAVAŞ (b)	Standart (Stepwise)	3	2	2	4	2	80
YAVAŞ	0.25 M Sukroz	10	4	0	0	1	33
ULTRA HIZLI (b)	Standart (Stepwise)	4	1	1	4	3	69
ULTRA HIZLI (b)	0.25 M Sukroz	10	2	1	1	1	33

a - 0: Gelişme yok, 1: Blastosit, 2: Expanded Blastosit, 3: Hatching Blastosit, 4: Hatched Blastosit

b- Çözünmeden sonra bir adet embriyo geri elde edilememiştir.

### Embriyoların Çözdürülmesi ve Kriyoprotektantların Uzaklaştırılması

Embriyoların çözdürülmeleri genellikle 37°C'deki su banyosunda 10 saniye ile 1 dakika arasında değişmektedir.

Kriyoprotektantların dondurulma şekline bağlı olarak embriyodan uzaklaştırılması gerekmektedir. Embriyoların direkt olarak izotonik PBS içine nakledilmeleri embriyonun hızla su alarak şişmesine sebep olur. Bu şokun önlenmesi için kriyoprotektantların basamaklar halinde uzaklaştırılması gerekmektedir. Kriyoprotektantların basamaklar halinde uzaklaştırılması sonucunda embriyo hacminin arttığı gözlenir.

Sukroz hücrelerin içerisine nüfuz edememektedir. Ayrıca sukrozun bulunduğu ortamda kriyoprotektant maddeler embriyodan daha çabuk ayrılır. Sukroz konsantrasyonu ile

kriyoprotektantların embriyodan ayrılmaları arasında bir ilişki mevcuttur. Sukroz konsantrasyonunun düşük olması halinde kriyoprotektantlar yavaş, yüksek olması halinde ise hızla embriyodan ayrılırlar (Maurrer 1978).

Kriyoprotektantların uzaklaştırılmaları değişik sukroz konsantrasyonları ihtiva eden PBS içerisinde 10 dakikalık ekilibasyonlarla 3 defada olmaktadır (Tervit ve Goold 1984).

### Embriyoların Kültüre Edilmeleri

Deneysel manipulasyonlar ve embriyo elde edilmesi ile transfer arasındaki depolama süresince embriyolar 37 °C'deki kültür ortamında tutulurlar. İn vitro olarak embriyoların gelişme hızı normal in vivo gelişim hızının 2/3'ü kadardır.

Koyunlarda 4'ten 32 hücreli aşamaya kadar olan embriyolar ortak kültür vasatında kültüre edilebilirler. Embriyolar toplama ve nakil arasında çevre ısısında

(15-25 °C) bir kaç saat süreyle kültür içerisinde tutulabilirler (Schneider ve Mazur 1986).

Embriyolar % 5 CO<sub>2</sub> ve su buharına doymuş atmosfer ihtiva eden etüvde 37 °C'de 48-72 saat süreyle kültüre edilmektedir.

Kültür amacıyla,

- mKRBL (modifiye Krebs-Ringer BikarbonatÇözeltisi)+ HAMS F-10+FCS

- % 5 CO<sub>2</sub> gerektirmeyen Dulbecco's phosphate buffered saline

- Dulbecco's phosphate buffered saline+ D-glucose 100 mg/L Sodyum Pyruvate 36 mg/L başarıyla kullanılmaktadır.

#### KAYNAKLAR

Cocero MJ, Procureur R, De la Fuente J, Chupin D (1988) Glycerol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos. *Theriogenology*, 29, 1, 238.

Fahning ML, Garcia MA (1992) Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*, 29, 1-18.

Heyman Y, Vincent C, Garnier V, Cognie Y (1987) Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. *Vet. Rec.*, 83-85.

Leibo SB (1988) Cryopreservation of embryos. In "Proceedings of the 11.th International Conference" on: *Anim. Reprod. and A. I.*, 5, 370-377, Dublin, Ireland.

Maurer RR (1978) Freezing mammalian embryos: A review of the techniques. *Theriogenology*, 1, 45-67.

Merry DA, Bondioli KR, Allen RL, Wright, RW (1984) One-step sucrose dilution of frozen-thawed sheep embryos. *Theriogenology*, 22, 4, 433-443.

Niemann H (1991) Cryopreservation of ova and embryos from livestock : Currents status and research needs. *Theriogenology*, 35, 1, 109-125.

Rall WF (1992) Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.*, 28, 237-245.

Schiewe MC, Rall WF, Stuart LD, Wildt DE (1990) In situ straw dilution of ovine embryos cryopreserved by conventional freezing or vitrification. *Theriogenology*, 33, 1, 321.

Schneider U, Hahn J, Sulzer H (1974) Erste Ergebnisse der Tiefgefrierkonservierung von Mause und Kanincheneizellen, *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 81, 448-470.

Schneider U, Mazur P (1986) Implications and applications of the long-term preservation of embryos by freezing. In "Current Techniques in *Theriogenology*" Edited by D.A. Morrow, 81-83, W.B. Saunders, London.

Schröder U (1988) Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von ungeteilten und geteilten Rinderembryonen unter Verwendung von Glycerin und Gelee Royal. *Vet. med. Diss.*, Hannover.

Tervit HR, Goold PG (1984) Deep-freezing sheep embryos. *Theriogenology*, 21, 1, 268.

Ware CB, Boland MP (1987) Effect of varying glycerol and sucrose concentration combinations on embryo survival rate in a one-step cryoprotectant removal from frozen-thawed ovine embryos. *Theriogenology*, 27, 5, 721-728.

Whittingham DG (1980) Principles of embryo preservation. In "Low Temperature Preservation in Medicine and Biology" Edited by M.J. Ashwood and J.F. Smith, 64-83, Clinical Research Centre, Harrow, Middlesex, United Kingdom.