

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KADIN GAMET HÜCRESİNDE OPTİMAL  
VİTRİFİKASYON ARAŞTIRMASI**

**Aslıhan ŞAYLAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**Danışman**  
**Prof. Dr. Selçuk DUMAN**

**KONYA – 2011**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KADIN GAMET HÜCRESİNDE OPTİMAL  
VİTRİFİKASYON ARAŞTIRMASI**

**Aslıhan ŞAYLAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. Selçuk DUMAN**

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı'nın  
2009/074 sayılı etik kurul kararı ile onaylanmıştır.

**KONYA – 2011**

## **i. ÖNSÖZ**

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Hasan Cüce'ye, Öğretim Üyesi hocalarım Prof. Dr. Serpil Kalkan, Prof. Dr. Aydan Canbilen ve Doç. Dr. T. Murad Aktan'a,

Laboratuvar aşamasındaki yardımları için Meram Tıp Fakültesi Tüpbebek Ünitesi değerli embriyologları Prof. Dr. Selçuk Duman'a, ünite çalışanlarına, yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

## ii. İÇİNDEKİLER

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| <b>ÖNSÖZ</b> .....                                             | i  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....                                       | ii |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....                           | iv |
| <b>1.GİRİŞ</b> .....                                           | 1  |
| 1.1. Kadın Genital Sistem.....                                 | 4  |
| 1.1.1. Ovaryum.....                                            | 4  |
| Ovaryumun Gelişimi.....                                        | 5  |
| Ovarial Foliküllerin Gelişimi.....                             | 5  |
| Ovumun Maturasyonu: Oogenez .....                              | 7  |
| Ovulasyon.....                                                 | 8  |
| Korpus Luteum.....                                             | 9  |
| Ovarial Hormonlar: Ovarial Siklus.....                         | 10 |
| Uterinal Siklus.....                                           | 11 |
| 1.1.2. Uterus.....                                             | 12 |
| Adventisya.....                                                | 12 |
| Endometriyum.....                                              | 12 |
| Miyometriyum.....                                              | 12 |
| 1.1.3. Ovidukt (Tuba Uterina).....                             | 13 |
| 1.1.4. Serviks ve Vajina.....                                  | 13 |
| 1.1.5. Dış Genital Organlar.....                               | 13 |
| 1.2. Kriyobiyojoloji.....                                      | 14 |
| 1.2.1. Tarihçe.....                                            | 14 |
| 1.2.2. Memeli Hücre Kriyobiyojolojisi.....                     | 14 |
| 1.3. Kriyoprezervasyonun Prensipleri.....                      | 16 |
| 1.4. Memeli Gamet ve Embriyo Kriyoprezervasyonu Çeşitleri..... | 18 |
| 1.4.1. Yavaş Dondurma.....                                     | 18 |

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.4.2. Hızlı Dondurma.....                                              | 19        |
| 1.4.3. Vitrifikasyon.....                                               | 19        |
| 1.5. Vitrifikasyon Solüsyonlarının Seçimi.....                          | 21        |
| 1.5.1 Kriyoprotektif Ajanların Çeşitleri .....                          | 23        |
| Permeabl Kriyoprotektif Ajanlar.....                                    | 24        |
| Nonpermeabl Kriyoprotektif Ajanlar.....                                 | 26        |
| 1.6. Vitrifikasyon İşleminde (Donma-Çözme) Şekillenen Olaylar.....      | 27        |
| 1.7. Oosit Kriyoprezervasyonunun Tarihçesi ve Nedenleri.....            | 29        |
| 1.7.1. Dondurulma Sürecinde Oosit Zarı ve Mikrotübüler Etkileşim.....   | 31        |
| 1.7.2. Oosit Kriyoprezervasyonunun Hücresel Komponentlere Etkileri..... | 34        |
| 1.8. Oosit ve Embriyo Taşıyıcıları.....                                 | 35        |
| <b>2. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>                                          | <b>36</b> |
| 2.1. Vitrifikasyon İşlemi İçin Yapılan Ön Hazırlıklar.....              | 37        |
| 2.1.1.Vitrifikasyon Solüsyonlarının Hazırlığı.....                      | 37        |
| 2.1.2.Soğuk Yüzey Hazırlığı.....                                        | 38        |
| 2.1.3.Taşıyıcıların Hazırlığı.....                                      | 38        |
| 2.1.4. Çözme Solüsyonlarının Hazırlığı.....                             | 39        |
| 2.1.5. İnkübasyon Solüsyonlarının Hazırlığı.....                        | 39        |
| 2.1.6. ICSI Hazırlığı.....                                              | 40        |
| 2.2. Vitrifikasyon İşlemi.....                                          | 40        |
| 2.3. Çözme İşlemi.....                                                  | 44        |
| 2.4. Morfometrik Analiz.....                                            | 45        |
| 2.5. Çalışma Grupları.....                                              | 46        |
| <b>3. BULGULAR.....</b>                                                 | <b>49</b> |
| <b>4. TARTIŞMA.....</b>                                                 | <b>61</b> |
| <b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>                                        | <b>85</b> |
| <b>6. ÖZET.....</b>                                                     | <b>88</b> |
| <b>7. SUMMARY.....</b>                                                  | <b>89</b> |

|                                               |            |
|-----------------------------------------------|------------|
| <b>8. KAYNAKLAR.....</b>                      | <b>90</b>  |
| <b>9. EKLER.....</b>                          | <b>102</b> |
| <b>EK.A: Etik Kurul Onay Formu.....</b>       | <b>102</b> |
| <b>EK.B: Bilgilendirilmiş Onay Formu.....</b> | <b>103</b> |
| <b>10. ÖZGEÇMİŞ.....</b>                      | <b>105</b> |

### iii. SİMGELER VE KISALTMALAR

**°C:** Santigrat  
**µm:** Mikrometre  
**BSA:** Bovine Serum Albumin  
**ÇS:** Çözme Sonrası  
**DMSO:** Dimetil Sülfoksit  
**EG:** Etilen Glikol  
**ET:** Embriyo Transferi  
**FSH:** Folikül Stimüle Hormon  
**GnRH:** Gonadotropin-Releasing Hormone  
**GV:** Germinal Vezikül  
**GVBD:** Germinal Vesicle Breakdown  
**hCG:** Human Chorionic Gonadotropin  
**HEPES:** (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid )  
**HES:** Hidroksietil starch  
**HMG:** Human Menapozal Gonadotropin  
**HSA:** Human Serum Albumin  
**HTF:** Human Tubal Fluid  
**ICSI:** Intra Cytoplasmic Sperm Injection  
**IVF:** In Vitro Fertilisation  
**IVM:** In Vitro Maturasyon  
**KPA:** Kriyoprotektif Ajan  
**LH:** Luteinizan Hormon  
**LN<sub>2</sub>:** Likit Nitrojen (Sıvı Azot)  
**M:** Molarite  
**MI:** Mayoz I  
**MII:** Metafaz II  
**OHSS:** Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu  
**OPS:** Open Pulled Straw  
**PAS:** Periyodik Asit Schiff  
**PEG:** Polietilen Glikol  
**PN:** Pronükleus  
**PrOH:** Propandiol  
**PVP:** Polivinil pirolidon  
**recFSH:** Recombinant FSH  
**VÖ:** Vitrifikasyon Öncesi  
**YÜT:** Yardımcı Üreme Teknikleri

## 1. GİRİŞ

Kriyoprezervasyon çok düşük ısıda canlı hücre veya dokunun, minimum hasarla ve fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır. Kadın yumurta hücresi (oosit), erkek sperm hücresi, embriyoların ve çeşitli dokuların endikasyonu konulmak şartıyla dondurularak saklanabilmesi, yıllar sonra ihtiyaç halinde kullanma olanağı sağladığı için gerek hastalar gerekse tüpbebek teknolojisinin gelişimi açısından çok önemlidir (Mahmoudi ve ark 2008). Özellikle ailede erken menopoza öyküsü, geçirilmiş yumurtalık cerrahisi, kemoterapi veya radyoterapi öyküsü olan kadınlarda fertilitenin devamı için yapılan oosit veya ovarial doku kriyoprezervasyonu, yeni ufuklar açmıştır (Farsani ve ark 2007).

İnsan gamet ve embriyoları in vivo ortamda farklı gelişimsel hücre evrelerinde iken canlı kalmak için değişik fizyolojik ihtiyaçlar göstermektedirler. In vitro ortam olan tüm laboratuvar prosedürleri ise insan gamet ve embriyolarının hasarlanabileceği ortamlardır. Kriyoprezervasyonda temel prensip donma ve çözünme sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek, oositlerin buz kristallerinden görece zararı önlemektir. Bunu sağlamak amacıyla hücre içi sıvısının, hücre membranından geçebilen başka bir deyişle nüfuz edebilen kriyoprotektif ajanlarla (KPA) yer değiştirmesi hedeflenmektedir. Kriyobiolojide soğutma hızı dondurma işlemi sırasında çok hızlı olursa hücre içindeki su dışarı çıkamaz, intrasellüler buzlanma olur ve hücre ölebilir. Dondurma işlemi çok yavaş olursa, zararsız hücre dışı buzlanma gerçekleşirken, ortamın ozmolalitesindeki artış ve hücrenin dehidrate olması hücre hasarına veya ölmesine sebep olabilir. Dolayısıyla optimal bir soğutma

hızı kullanılmalıdır. İşleme alınacak hücrenin fiziki ve kimyasal özellikleri iyi bilinmelidir (Liebermann ve ark 2002a).

Kriyoprezervasyon ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda, vitrifikasyon isimli dondurma sistemi geliştirilmiştir. Vitrifikasyonda KPA'ların dondurma işleminde buz oluşumunu baskılamaları en önemli unsurdur ve sıcaklık düştükçe, solüsyon tümüyle viskoz bir hal alarak sonunda camsı bir faza geçmektedir (Fahy ve ark 1984). KPA'lar sudan daha yavaş olarak hücre membranından pasif olarak geçebilirler ve suyun yerini alırlar. KPA'larla karşılaşan hücreden kimyasal dengenin devamlılığı için su çıkışı olur ve hücre büzülür (Rama Raju ve ark 2006). Bu işlem sırasında buz kristali oluşumu minimaldir.

Öldürücü buz kristallerinin oluşumu donma aşamasındakine kıyasla çözünme aşamasında daha hızlı şekillenmektedir. Bu nedenle, vitrifikasyondan sonra canlılıklarını sürdürebilmeleri, aynı zamanda, devitrifikasyon sırasında meydana gelebilecek zararların da önlenmesine bağlıdır (Sağırkaya ve Bağış 2003).

Ancak oositleri dondurma işlemi teknik olarak daha zor ve kısa bir süre öncesine kadar başarı oranı oldukça düşüktü. Oositlerdeki dondurma-çözdürme sonucu oluşan hasarlarda dondurulan hücrelere zarar veren buz oluşumundaki kristaller, hücre içindeki membranlara zarar vermektedir. Meydana gelen hasarın büyüklüğü buz kristallerinin miktarından ziyade, hücre içinde oluşan buzun hacmi ile ilişkili olmaktadır. Hızlı soğutulan hücrelerde, buz kristalleri daha küçük ebatlarda oluşmaktadır.

Genel bir kural olarak, tek bir hücrenin dondurulması, hücre kitlelerinin dondurulmasına göre daha başarılı olsaydı da memeli oositleri için bu durum geçerli değildir. Memeli oositleri, dondurulmaya karşı zigot ve embriyo dönemine göre daha duyarlı bulunmaktadır (Mavrides ve Morroll 2002). Oositler vücudun en büyük hücrelerinden biri olup, ısı değişikliklerine oldukça duyarlıdır. Bu anlamda soğutma sırasında meydana gelen soğuk hasarı donmanın meydana gelmediği düşük sıcaklıklara, kısa süreli maruz kalma sonrasında gelişen ve esas hedefi plazma membranı olan, dönüşümsüz bir etki olarak tanımlanmaktadır (Orief ve ark 2005).

Soğutulan oositlerde hücre iskeleti organizasyonunun bozulması, kromozom ve DNA anomalileri, iç hasarı, prematüre kortikal granül dağılımı ve zona pellusida hasarı gibi değişik bozukluklar bildirilmektedir. Bütün bu hasarlar, oositin fertilizasyonunu ve ileriki gelişim basamaklarına geçme kapasitesini düşürmektedir. Bütün bunların sonucunda döllenme olmamakta veya anormal bir embriyo oluşumuna neden olabilmektedir (Chen ve ark 2001, Kim ve ark 2006).

Ancak son zamanlarda dondurma-çözme tekniklerindeki gelişmeler sayesinde canlı ve normal morfolojide oosit elde etme oranları oldukça yükselmiştir. Böylece taze oosit kullanımına yakın doğum oranları elde edilmiştir.

Bu çalışmada insan metafaz II (MII) oositlerinin değişik yüzdelerde ve sürelerde permeabl ve nonpermeabl KPA'lar kullanılarak vitrifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Çözme sonrası oositlerin morfolojik görüntüleri ve fertilizasyon oranları değerlendirilmiş olup insan oosit vitrifikasyonu için optimal bir metod bulunması amaçlanmıştır.

## **1.1.Kadın Genital Sistem**

Kadın üreme sistemi ovaryumları, genital kanalları (tuba uterina, uterus, vajina) ve dış genital yapıları kapsar. Hormonlar ve sinirler tarafından kontrol edilen bu sistemin temel fonksiyonu oogenez ile oosit üretimi ve döllenme sonucu implantasyon ile doğuma kadar destek sağlamaktır (Junqueira ve ark 1998).

### **1.1.1. Ovaryum**

Overler, endokrin ve ekzokrin salgı yapan bir çift bezdir. Bu bezler hafif düz, ovoid şekilli yaklaşık 4 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde ve 1 cm kalınlığındadır. Pelvik kavitenin lateral duvarında uterusun her iki tarafında uzanırlar. Her biri bir kenara mezoovaryum ile tutunmuştur. Hilumda vasküler bağ dokusu (mezoovaryum) overial stroma ile devam eder. Hilumda mezoovaryumun peritoneal örtüsü küboidal hücre tabakası ile devam eder. Overlerin yüzeyleri germinal epitelyum olarak adlandırılan ve tüm yüzeyi örten basit yassı ya da kübik epitelyum ile kaplıdır. Germinal epitelin altında, ovaryumun beyazımsı rengini veren tunika albuginea denilen bağ dokusu katmanı bulunur (Leeson ve ark 1988).

Ovaryum dış ve iç tabaka olmak üzere 2 zona ayrılır. Dış tabaka korteks iç tabaka medulladır. 2 zon arasındaki sınır belli değildir. Medulla, çok sayıda kan damarı, lenfatik ve sinirleri kapsayan gevşek bağ dokudan meydana gelir.

Korteks, ovarian folikülleri içeren hücresel stromadan oluşan sıkı bir yapıdır. Stromayı düzensiz, dairesel sıralanmış iç şekilli hücreler ve retiküler fibriler ağ oluşturur. Elastik fibriller seyrek ve sadece kan damarlarının duvarlarında bulunur (Kalaycı 1986).

Foliküller, gelişimin bütün basamaklarında korteks bölgesinde görülebilir. Puberte öncesi sadece primordial ya da primitif foliküller görülür. Seksüel olgunluk, büyüyen foliküllerin bulunması ve onların atreziye uğraması ile karakterizedir. Menopoz sonrası foliküller gözden kaybolur ve korteks fibröz bağ dokudan oluşan dar bir zon olarak kalır (Ovalle ve Nahirney 2009).

### **Ovaryumun Gelişimi**

Embriyonik yaşamın yaklaşık birinci ayında, primordial germ hücrelerinden oluşan küçük bir hücre topluluğu vitellus kesesinden gonadlara göç eder. Gonadlarda bu hücreler bölünerek oogoniumlara dönüşür. Bölünmeler o kadar yoğundur ki, uterus içinde yaşamın ikinci ayında yaklaşık 600 000, beşinci ayı dolaylarında 7 milyonun üzerinde oogonium vardır. Üçüncü aydan başlayarak oogoniumlar birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girmeye başlarlar. Ancak bölünme diploten evresinde durarak mayoz bölünmenin diğer evrelerine ilerlemez. Bu hücreler primer oositlerdir ve foliküler hücreler olarak adlandırılan yassı hücrelerle çevrilidir. Gebeliğin yedinci ayına ulaşıldığında, oogoniumların çoğu primer oositlere dönüşmüştür. Ancak, primer oositlerin çoğu, atrezi olarak adlandırılan bir yıkımla yok olur. Sonuç olarak puberte evresinde overler yaklaşık 300 000 oosit içerir. Atrezi, kadının üreme çağı boyunca sürer ve 40-45 yaşlarında yaklaşık 8 000 oosit kalır. Her aybaşı döngüsünde (ortalama süre 28 gün) genellikle tuba uterinaya tek bir oosit serbest bırakıldığından ve kadının doğurganlık çağı 25-30 yıl sürdüğünden, yaklaşık 400 kadar oosit salınmış

olur. Tüm diğer oositler atrezi yoluyla ortadan kaldırılır (Gougeon ve ark 1994, Sadler 2000).

### **Ovarial Foliküllerin Gelişimi**

Yeni doğanda yaklaşık 400 000 primer folikül olduğu hesaplanmıştır ve sayı menopoza yaklaştıkça düzenli olarak azalır ve menopoz sonrası hemen hemen hiç kalmaz. Foliküllerin çoğu primordial foliküldür. Çapları yaklaşık 40 µm kadardır. Bu foliküller immatür oositi oluşturur. Primer oosit tek tabakalı epitelyum (folikül) hücreleri ile çevrilidir. Oosit iri bir nükleolus ve geniş veziküler bir nükleusa sahip sferoidal bir hücredir. Sitoplazması opak ve granülerdir. İri bir golgi kompleksi, annulata lamella ile çok sayıda mitokondri ve küçük veziküllere sahiptir. Oositi çevreleyen foliküler hücrelerin tek tabakası, bazal bir lamina ile ovarial stromadan ayrılır (Junqueira ve ark 1998).

Puberteden sonra meydana gelen folikül gelişimi, ovumun gelişmesi, farklılaşması ve stromal hücrelerin bağ doku ile sarılması olarak tanımlanır. İmmatür oositte ilk olarak hacim artışı meydana gelir. Etrafında zona pellusida şekillenir. Zona pellusida glikoprotein içerir. Canlı iken homojen görünür. Periyodik asit schiff (PAS) boyası ile parlak boyanır. Foliküler hücreler ile çevrenmesine rağmen oosit de zonanın gelişimine katkıda bulunur. Yassı foliküler hücreler ilk önce küboidal ve sonra prizmatik şekle dönüşür. Bu hücreler granüloza hücrelerinin meydana getirdiği stratum granulosum ve ovumun çevresinde çok katlı bir tabaka oluşturmak üzere aktif olarak bölünürler. Böylece tek tabakalı primordial folikül çok tabakalı primer foliküle dönüşmüş olur. Primer folikülün hacmi arttıkça komşu stroma hücreleri bir

kapsüle organize olur. Bu dönem teka hücrelerinin ortaya çıktığı dönemdir. Teka hücreleri bir bazal lamina ile stratum granulosumdan ayrılır ve 2 tabakaya farklılaşır. İçteki vasküler tabakaya teka interna, dıştaki fibröz tabakaya teka eksterna denir. Teka interna geniş stromal hücreler içerir ve bu hücreler salgı yaparlar. Ayrıca çok sayıda kapiller içerirler. Teka eksterna ise sıkıca paketlenmiş kollajen fibrillerden ve içi hücrelerden oluşur. Periferde ovarial stroma ile birleşir. Foliküler hücrelerin gelişimi oositin her tarafında aynı hız ve boyutta olmaz. Bu yüzden gelişim döneminde foliküller ovoid şekle dönüşür. ve oosit eksantrik pozisyon alır. Bu oluşurken folikül kademeli olarak derin bir tabaka oluşturur (Junqueira ve ark 1998).

Stratum granulosum 8-12 tabakalı olduğu zaman foliküler kitleden meydana gelen sıvı ile düzensiz küçük boşluklar doldurulur. Foliküler tabakanın iç tarafındaki bu boşluğa antrum boşluğu denir. Folikül de antral folikül ya da sekonder folikül olarak tanımlanır (Leeson ve ark 1988).

Sekonder foliküldeki antrum boşluğu folikül sıvısı içerir. Bu sıvı hiyaluronik asitten zengin visköz bir sıvıdır. Granüloza hücresi ile çevrelenmiş olan oosit, antral kavitenin bir kenarında ovulasyona hazır olacak şekilde sıkıştırılmıştır. Bu eksantrik tümsek kumulus ooforus olarak tanımlanır. Kumulus ooforusun granüloza hücreleri oosit ile ilişkilidir ve ışınal şekilde sıralanarak korona radiatayı oluşturur ve oosit zona pellusida ile birlikte ayrılır. Korona radiata hücreleri oositin hücre membranı ile temas halindedir ve zona pellusida boyunca uzanır. Ayrıca oositin mikrovillusları da zona pellusida içine doğru uzanır. Granüloza hücrelerinin oluşturduğu epitelyum hücreleri antrum boşluğunun çevresinde düzensiz tabakalar halinde bulunur. Granüloza hücreleri arasında yoğun boyanan küçük yığınlar görülür. Bu ekstrasellüler

materyale Cell-Exner cisimleri denir. Bu cisimler PAS pozitif boyanır (Leeson ve ark 1988, Junqueira ve ark 1998).

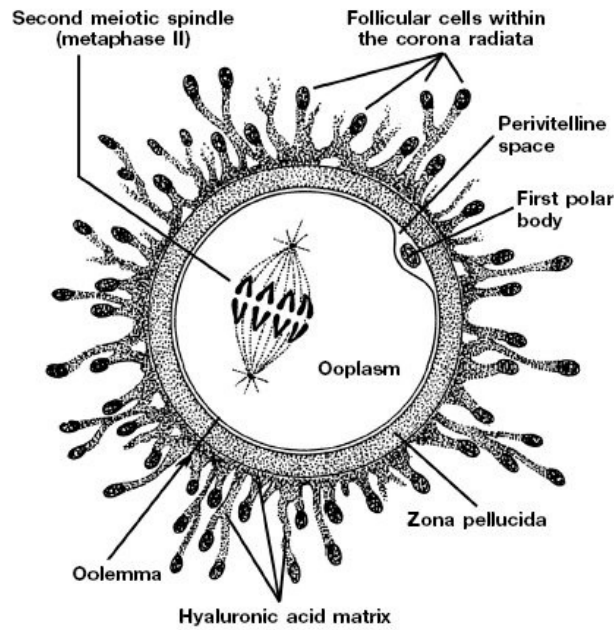
Bir folikül 10-14 gün içinde maturasyonunu tamamlar. Matür bir folikül yaklaşık 18-20 mm çapa sahip olup kortekse yerleşmiştir ve medullada bir çentik oluşturur. Bu ovaryumun yüzeyinde bir şişliktir ve stigma adını alır. Tunika albuginea ve teka hücre tabakaları incelmıştır. Folikül sıvısı ile genişlemiş olan antrum, stratum granulosuma bağlıdır. Oosit boyut olarak maksimum olur. Kalın bir zona pellusida ve göze çarpan bir korona radiata ile sarılmıştır. Folikül maturasyonu sağlandığı zaman düzensiz küçük boşluklar folikül sıvısı ile dolar ve korona radiata hücreleri arasında görülmeye başlar. Böylece stratum granulosum ile oosit arasındaki bağlantı zayıflar (Kalaycı 1986, Junqueira ve ark 1998 ).

Teka hücre tabakaları matür foliküldeki en önemli gelişimi sağlar. Teka interna hücreleri steroid salgılayan hücrelerdir ve östrojen gibi dişi seks hormon prekürsörlerini üretir. Teka eksterna kollajen fibrillerden ve fusiform hücrelerden oluşmuş bir bağ dokusudur. Hormon salgılama fonksiyonuna sahip değildir (Leeson ve ark 1988).

### **Ovumun Maturasyonu: Oogenez**

Ovulasyonda serbest hale gelen oosit bir sekonder oositir ve teknik olarak immatürdür. Fertilizasyon için hazırlıkta spermatozoaya benzer şekilde bir seri nükleer değişiklikler geçirir. Diploid sayıda kromozom içeren oogonia ya da primitif ovum mitotik bölünmeler geçirerek fetal ovaryumda primer oositleri oluşturur. Foliküler gelişim sırasında primer oositler büyür ve sonra 2 maturasyon bölünmesi geçirerek matür hale gelir. Kromozomlar haploid

sayıya iner. İlk olgunlaşma bölünmesi ovulasyondan hemen önce ve matür folikülün içinde meydana gelir. Kardeş hücreler arasında kromozomlar eşit olarak paylaşılır. Fakat sitoplazma bölünmesinde eşit bir paylaşım olmaz. Kardeş hücrelerden birisi sekonder oosit olarak isimlendirilir ve ana hücrenin sitoplazmasının tamamını alır. Diğer hücre ise birinci polar cisimdir ve sonra dejenere olur. Her iki hücre de 23 kromozama sahiptir. Bu sırada ovulasyon meydana gelir ve sekonder oosit folikülden serbestleşir. Bu süreçte sekonder oositin nukleusu sekonder maturatik bölünmeye başlar. Bölünme metafazda durur ve fertilizasyona kadar bu durumda kalır. Sperm başının oosite penetre olması ile bu 2. mayoz bölünme stimüle olur ve tekrar eşit olmayan sitoplazmik bir bölünme meydana gelir. Büyük sitoplazmaya sahip olan hücre matür oositir. Diğer hücre ise 2. polar cisimdir. Böylece bir primer oositin yalnızca bir kardeş hücresi fonksiyonel hale gelir. Diğer dejenere olur (Kalaycı 1986).

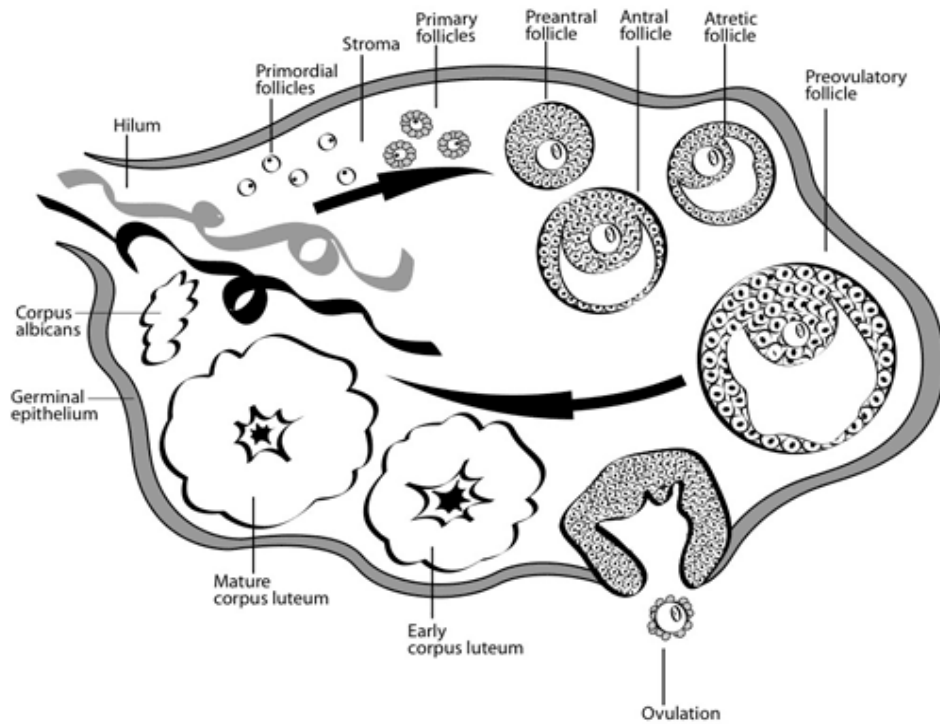


**Şekil 1.1.** Oosit (academiavita 2010).

## Ovulasyon

Folikül maturasyonu tamamlandığı zaman sıvı sekresyonu artar ve folikül çapındaki genişlemeden dolayı önceki durumdan daha sulu bir hale gelir. Bu preovulatuvar şişme olarak isimlendirilir. Folikül ince bir korteks ile kaplanmıştır ve stigmadan ruptüre olur ve foliküler sıvı periton boşluğuna sızar. Korona radiata ve zona pellusida ile çevrili oosit kumuluslara doğru yırtılarak uzaklaşır ve sıvı içerisinde dağılır. Bu sürece ovulasyon denir (Cihangir 2009).

Genellikle ovulasyon sonucunda 1 tane oosit atılır. Fakat bazı durumlarda 2 ya da nadiren daha çok oosit ovulasyona uğrayabilir. İlaçlar ovaryan aktiviteyi stimüle edebilir ve çok sayıda folikül eş zamanlı maturasyona uğrayabilir. Böylece multipl doğumlarda artış olur. Serbest hale gelen oosit genellikle fallop tüplerinin infundibulumuna doğru gider ve fertilizasyon kapasitesi 24 saat sürer. İnsanda dişide ovulasyon ortalama 28 günde bir tekrar eder (Leeson ve ark 1988).



**Şekil 1.2.** İnsan Over Foliküllerinin Basamakları (Silber 2006).

**Korpus Luteum**

Ovulasyondan sonra bazen folikül boşluğunun içine doğru küçük bir kanama olur. Folikül duvarı kollabe olur ve katlantıların içine doğru atılır. Folikül duvarı geçici olarak glandular bir yapıya dönüşür. Bu yapı korpus luteum adını alır. Atılan ovum fertilize olmaz ise korpus luteum ovulasyondan sonra yaklaşık 9 günde en büyük gelişimine ulaşır ve sonra dejenere olur. Bu menstruasyon korpus luteumudur. İlk önceki zengin vaskülarizasyon azalır. Şayet oosit döllenmiş ise korpus luteum hacim olarak artar ve gebelik korpus luteumu oluşur. Yaklaşık 1 000 kadar folikül maturasyona ulaşmasıyla birlikte fetal hayatta ve puberte sırasında çok sayıda folikül atreziye uğrar. İnsanda dışideki reproduktif aktivite periyodu yaklaşık 30 yıldır. Bu süre içerisinde folikül grupları her bir menstruasyon siklusunda matür olmaya başlar. Fakat gebelikle her ay sadece bir oosit atılır. Bütün başarısız foliküller ya primer folikül iken ya da gelişimin herhangi bir periyodundaki folikül iken dejenerasyona uğrar. Atrezi ilk önce oositte meydana gelir. Bunu foliküler hücrelerin dejenerasyonu izler (Junqueira ve ark 1998).

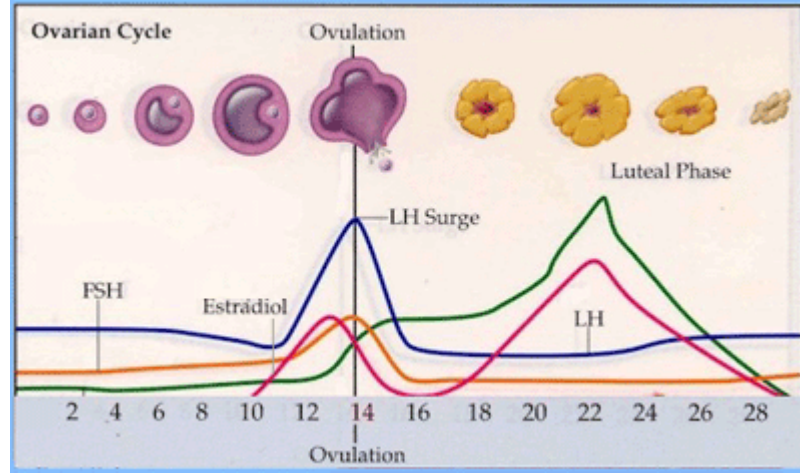
**Ovarial Hormonlar: Ovarial Siklus**

Overler, germ hücrelerini üretmenin yanında dişi seks hormonlarını da (bir tür steroid olan östrojen ve progesteron) üretirler. Östrojen hormonu esas olarak gelişen foliküller tarafından üretilir. Progesteron ise korpus luteum

tarafından üretilir. Östrojen hormonu dişi üreme sisteminin ve meme bezlerinin büyüüp gelişimini indükler (Kayaalp 2000).

Ovaryumda meydana gelen folikül gelişimi, ovulasyon ve korpus luteum şekillenmesi gibi ardışık gelen yapısal değişiklikler yüzünden bu hormonların seviyesi düzenli periyodik dalgalanmalar gösterir. Östrojen salgısı preovulatuvar periyotta yükselir. Ruptüre olmuş folikülün luteinizasyonu sırasında progesteron üretimi hızlıca artar ve korpus luteum gerilemesine kadar bu seviyede kalır. Bu periyodik değişikliklerden ovarial salgı aktivitesindeki ritmik değişimler sorumludur. Ovarial siklusun tekrarı hipofiz bezinin anterior lobu tarafından salgılanan gonadotropinler tarafından aktive edilir. Gonadotropinler; Folikül Stimüle Hormon (FSH) ve Luteinizan Hormon (LH) folikül maturasyonunu kontrol eder ve korpus luteumu oluşturur. Ovarial siklusun başlangıcında; hipofiz tarafından FSH üretimi artar ve bu primordial foliküllerin gelişmesini sağlar. Foliküllerden biri diğerlerinden daha hızlı gelişir ve diğerleri dejenere olur ve sonra atrezi oluşur. FSH ve LH birlikte matür foliküllerin olgunlaşmasını sağlar ve ovulasyon gerçekleşir. Sonra da korpus luteum gelişir. Ayrıca hipofizden LH serbestlendiğinde korpus luteum tarafından progesteron seviyesinin artması engellenir (Kayaalp 2000).

Şayet gebelik meydana gelmezse korpus luteum gelişimini durdurur. Korpus luteum geriledikçe östrojen seviyesi düşer. Hipofiz tarafından FSH'ın serbestleşmesi ile folikül gelişimi için yeni bir siklus başlar (Ovalle ve Nahirney 2009).



**Şekil 1.3.** Ovarial Siklus ve Hormonlar (Menstrual Cycle:Pre&Post Ovulation 2010).

### Uterinal Siklus

Proliferasyon fazı siklusun 5-15. günleri arasındır. Proliferasyon fazı aynı zamanda ovaryum foliküllerinin gelişimi ve östrojenlerin üretimine rastlaması sebebiyle foliküler faz olarak da bilinir. Proliferatif faz boyunca hücresel çoğalma devam eder. Böylece hem bezler hem de endometriyumun yüzey epiteli yenilenir. Bağ dokusu hücrelerinin çoğalması ve lamina propria içinde ana maddenin birikimi aynı zamanda olur. Bu da endometriyumun bir bütün olarak büyümesine sebep olur. Sekresyon fazı siklusun 14-28. günleri arasını kapsar. Bu faz ovulasyondan sonra başlar. Korpus luteum tarafından salgılanan progesteron hormonunun etkisi altındadır. Östrojen ve progesteron etkisi ile bezler gelişir. Bu fazda endometriyum, salgı ürünlerinin toplanması ve stromadaki ödemin bir sonucu olarak maksimum kalınlığa (5 mm) ulaşır (Kalaycı 1986).

Menstrual siklus süresi değişebilir, ancak ortalama süre 28 gündür. Menstrual siklus ekseriya 12-15 yaşları arasında başlar, 45-50 yaşa kadar devam eder. Oosit üretimi için ovaryumdaki değişimlerinin bir sonucu olarak

ortaya çıkar ve dışının sadece menstrual siklusa sahip olduğu yıllar esnasında döllenebileceğini gösterir. Menstruasyon fazı siklusun ilk 4 günü olarak belirir (Junqueira ve ark 1998).

### **1.1.2. Uterus**

Uterus armut şekilli bir organ olup, genişleyen üst kısmı gövde (korpus) uterus boşluğunun incelen üst bölümü (internal os) ve internal osun aşağısına uzanan silindirik boyun kısmı serviksten ibarettir. Uterus tüplerinin uterus gövdesine girdiği kısım fundus ismini alır. Uterus belirgin şekilde kalındır ve 3 tabakadan oluşur:

- **Adventisya**

Uterusun en dış tabakasında ya seroza (bağdokusu ve mezotelyum) veya adventisya (bağdokusu) bulunur. Diğer uterus tabakaları ise düz kasın kalın bir tunikasını oluşturan miyometriyum ile endometriyum veya uterus mukozasıdır (Kalaycı 1986).

- **Endometriyum**

Endometriyum, epitelyum ile basit tübüler bezler ve bazen onların daha iç kısımlarındaki dallanmalarını içeren lamina propriadan ibarettir. Endometriyal tabaka 2 zon ile alt bölümlere ayrılabilir. Bunlar her menstrual siklus esnasında menstruasyonla dökülen ve tekrar yenilenen kısmı teşkil eden fonksiyonel tabaka ile menstruasyon sonu hemen çoğalarak yenilenen kısmı olan bazal tabakadır (Junqueira ve ark 1998).

- **Miyometriyum**

Miyometriyum bağ dokusu ile ayrılmış düz kas lif demetlerinin oluşturduğu uterusun en kalın tabakasıdır. Düz kas demetleri 4 tabakadan meydana gelir. Birinci ve dördüncü tabaka uzamına sıralanmış fibrillerden oluşur, orta tabaka ise daha geniş kan damarları içerir (Kalaycı 1986).

### **1.1.3. Ovidukt (Tuba Uterina)**

Ovidukt (uterus tüpleri, yumurta kanalı) kastan yoğun bir kanaldır. 12 cm kadar bir uzunluğa sahiptir. Oviduktun serbest kalan uzantısı fimbria denen parmakrı genişlemelerle sağak biçiminde uzantılar içerir. Ovidukt duvarı 3 tabakadan yapılmıştır. Bunlar; mukoza, muskularis ve visseral peritondan oluşan serozadır.

Ovidukt, ovaryum tarafından serbest bırakılan oositi alıp uterusu taşıır. Tüpün lümeni döllenme için elverişli bir ortam olup buradaki sekresyonda gelişmenin erken safhaları esnasında embriyonun beslenmesine yardımcı olur. Ovulasyon esnasında, infundibulum fimbriaları ovaryumun yüzeyine hareket ederler. İnfundibulumun huni şeklini alması da serbest kalmış oositin yakalanmasını kolaylaştırır.

### **1.1.4. Serviks ve Vajina**

Serviks uterusun aşağı doğru uzamış olan silindirik kısımdır. Bu parça uterusun geri kalan kısımlarından histolojik yapı olarak farklıdır. Mukus salgısı yapan basit prizmatik epitelyum içerir ve birkaç düz kas lifi bulundurur, esas olarakta yoğun bağ dokusundan ibarettir. Servikal salgılar oositin dllenmesinde önemli bir rol oynar. Ovulasyon anında müköz salgılar sulanır ve spermin uterusu girişine imkan verir (Junqueira ve ark 1998).

Vajinanın duvarı bezlerden yoksundur ve 3 tabakadan yapılmıştır. Bunlar mukoza, musküler tabaka ve adventisyadır. Vajinanın lümeninde bulunan mukus, serviks bezlerinde oluşur. Mukozanın epiteli çok katlı yassıdır. Son derece fazla keratinazasyon vardır (Kalaycı 1986).

#### **1.1.5. Dış Genital Organlar**

Dişi dış genital organlar veya vulva; klitoris, labia majora ve labia minora tarafından sarılan bir yüzey içine vestibuluma açılan bazı bezlerden ibarettir (Junqueira ve ark 1998).

### **1.2. Kriyobiyoloji**

#### **1.2.1. Tarihçe**

Kriyobiyoloji yaşayan organizmaların düşük sıcaklıklarda özelliklerinin incelenmesidir. Kriyobiyolojinin tarihçesi 1600'l yılların sonlarına kadar uzanır. İnsanlar uzun yıllar düşük sıcaklıkların hücre ve dokulara zararlı etkilerinin olduğuna inanmışlardır. Henry Power soğuk hakkında teori kuran ilk kişidir. Soğuğun ldrc özelliğinin olmadığını bulmuştur. Power bir

kavanoz içindeki tuzlu suda yılan balığını dondurmuş çözme sonrası, dondurmadan önceki kadar aktif olduğunu görmüştür. Robert Boyle 'New Experiments and Observations Touching Cold' adında bir monograf yapmıştır. 1683 yılında yazdığı bu yazıda yaşayan hayvanlarda soğğun etkilerini tanımlamıştır (Luster 2004).

Kriyobiyolojideki diğer öncü Lazzaro Spallanzani'dir. 1700'lü yılların sonlarında birçok türün dokusunda geniş çalışmalar yapmıştır. Onların düşük sıcaklıklarda reaksiyonlarını incelemiştir. Luyet ve Gehenio (1940) 'Life and Death at Low Temperatures' adında bir kitap yayınlamışlar ve kriyobiyoloji için gerekli temel komponentleri özetlemişlerdir. 1940'ların sonlarında, Polge ve ark (1949) Cambridge Üniversitesi'nde tesadüfen gliserolün koruyucu etkisini keşfetmişlerdir. Bu keşif ile horoz ve kedi spermatozoasını başarılı bir şekilde dondurmushlardır. Donma hasarlarına karşı hücreleri korumak için gliserolün yeteneğinin keşfi, kriyobiyoloji biliminin gelişimine öncülük etmiştir (Luster 2004).

1951 yılında dondurulup çözünmüş sığır spermatozoasının suni tohumlaması yolu ile ilk buzağının doğması gerçekleşmiştir. Bu ilk çalışmalar şimdilerde kriyobiyoloji olarak bilinen bilim disiplininin gelişimini sağlamıştır (Mazur 2004).

### **1.2.2. Memeli Hücre Kriyobiyolojisi**

Bilimsel ve modern anlamda canlı hücre dondurma çalışmaları, 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının, gliserolün KPA başka deyişle soğuk şokuna karşı koruma sağlayıcı özelliğini bulması ile başlamış, dondurulan ilk hücre spermatozoa olmuştur. Bu anlamda kriyobiyoloji hücre, doku, organ ve

organizmaların dondurulmasını inceleyen bilim dalı olarak önem kazanmış ve dondurulan-çözdürülen hücrenin fizyolojik-fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılması bizi kriyobiyolojiye yönlendirmiştir (Bucak ve Tekin 2007).

Hücreler soğuk şokuna maruz bırakıldıklarında membransel ve ozmotik değişikliklere uğramaktadırlar. Bu değişiklikler hücrelerin çözme sonu yaşamını ve fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Özellikle gamet ve embrioların soğuk şoku ve ozmotik hasara karşı ortamlarına KPA eklenmesi, çözme sonrası canlılığı ve fertliletiyi optimize etmektedir. Son zamanlarda geliştirilen bazı membransel parametreler, KPA'ların ortama hangi oranda katılacağına saptanmasında kullanılmaktadır. Hücreler su içeriklerine, hacimlerine, soğutulma hassasiyetlerine ve hücre membranının sıvı permeabilite katsayısına göre spesifik soğutulma oranlarına sahiptir. Donma sırasında gametin su alışverişinin saptanması, hücrenin donmaya ve KPA'lara karşı ozmotik tepkisinin belirlenmesi, öldürücü etkili intrasellüler donma insidansının azaltılması ve KPA'ların optimum ilave oranlarının saptanması membran parametrelerinin belirlenmesine bağlıdır. Bu parametreler, ozmotik inaktif hacim, hidrolitik iletkenlik, eriyik permeabilitesinin aktivasyon enerjisi ve hücre yüzey/hacim oranıdır (Mazur 1990, Leibo ve Brandley 1999).

Hücre biyokimyasında, sıcaklığın değişmesine bağlı bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Sıcaklığın 37°C'den 7°C'ye kadar düşmesi ile enzim reaksiyonlarında yaklaşık olarak 8 katlık bir azalış meydana gelmektedir. Sıcaklığın düşmeye devam etmesiyle beraber hücrenin içinde bulunduğu sıvılarda da bazı fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelir. Hücrelerin dondurulmasında suyun biyolojik yapısının değişimi söz konusudur. Yani dondurma, suyun biyolojik olarak kristalleşmesi, şekil değiştirmesi ile gerçekleşir. Hücrelerin dondurulma işlemi sırasında,

ekstrasellüler solüsyonda kendiliğinden veya uyarılmayla  $-5^{\circ}\text{C}$  ile  $-100^{\circ}\text{C}$  arasında buz kristalleri şekillenir. Ancak intrasellüler ortam, hücre membranının etkisiyle henüz donmamıştır. Söz konusu oluşum esnasında ekstrasellüler suyun buzlaşması nedeniyle ortamda bulunan maddelerin yoğunluğunda artış meydana gelir. Bu durum kimi kimyasal maddelerin hücre içinde ve dışında farklı yoğunlukta bulunmalarına yol açar. Meydana gelen farklı yapı ya da denge nedeniyle bir kısım sıvının hücre dışına çıkışı ile bu kez de hücre içinde bulunan bir kısım erimiş maddelerin yoğunluğunda yükselme meydana gelir ve hücre içerisinde de kristaller oluşur (Delilbaşı 2008).

### **1.3. Kriyoprezervasyonun Prensipleri**

Kriyoprezervasyon biyolojik saati durdurarak, bu işleyişe bir müdahale imkanı sağlamıştır. Bir hücrenin kriyoprezervasyonu, hücrenin soğumasını ve düşük sıcaklıkta saklanmasını içerir. Bu sıcaklıkta hücrenin bütün metabolik süreci durur. Pratikte donmuş hücreler  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azot başka deyişle likit nitrojen ( $\text{LN}_2$ ) içerisinde saklanır (Özkavukçu ve Erdemli 2002).

Genel bir kural olarak kriyoprezervasyonda biyolojik objenin boyutu bir kriterdir. Küçük objeler çözme sonrası canlılık şansı daha çok olan örneklerdir. Virüs ve bakteriler basit metodlarla başarılı bir şekilde dondurulabilirler. Gelişimin ilk aşamaları biyolojik saati durdurma imkanı sağladığı için kriyoprezervasyon embriyolojide daha önemlidir. İnsan germ hücresi, zigot, 2 pronükleus (2PN), 2. gün ve 3. gün embriyoları soğuk hasarına blastosistten daha hassastır (Vajta ve ark 2007).

Bir hücrenin spesifik özelliklerinin bilinmesinin yeterli olacağı düşünülerek tek bir hücrenin dondurulmasının çok kolay olduğu düşünülür.

Sperm ve oositler tek başına dondurulabilen hücrelerdir. Fakat kriyoprezervasyona karşı daha hassastırlar. Bunun sebebi bu iki hücrenin füzyonu ile yeni bir yapının oluşması (zigot) ve fonksiyonu ile ilgilidir. Günümüzde en yaygın kriyo uygulamalar embriyo, spermatozoa ve bazı somatik hücrelerle dokuların dondurulmasıdır (Özkavukçu ve Erdemli 2002).

Memeli hücrelerinin başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu birçok değişkene bağlıdır. Bu değişkenler hücrelerin tipini, permeabilitesini hücrelerdeki sıvıların özelliklerini, onların doğal KPA bulundurup bulundurmadığını, hücrelerin soğutulma ve çözünme oranlarını içerir. Hücrelerin farklı tipleri farklı optimum soğutulma oranları sergiler. Bu soğutulma oranları 1000°C/dk'den yaklaşık 0,2°C/dk'ye kadar olan soğutulma oranlardır. Hücreler, >100 000°C/dk hızda soğutulduktan sonra bile hala canlıdırlar. Verilen bir hücre tipi için uygun bir KPA'nın tanımlanmasında optimum bir soğutma oranı ve uygun bir çözme oranı başarılı bir kriyoprezervasyon için anahtar niteliğindedir (Luster 2004, Vajta ve Kuwayama 2006).

Genel olarak kriyoprezervasyon 4 farklı basamağı gerektirir.

- 1) Hücre ve dokuların KPA'ya maruz bırakılıp 0°C'nin altındaki sıcaklıklara soğutulması.
- 2) -130°C'nin altında örneklerin saklanması.
- 3) Çözme işlemi (ısıtma ve erime).
- 4) KPA'ların dilüsyonu ve uzaklaştırılması (Mazur 2004).

Birçok türün hücre ve dokularını kriyoprezerve etmek için sayısız protokol vardır. Ünlversal bir protokol, hücreler arasındaki farklılıklardan

dolayı hücrelerin bütün tipleri için elverişli değildir. Hücresel hasarın ve kriyoprezervasyon kaynaklı ölümlerin sebebi tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Çünkü kriyoprezervasyon işlemi sırasında hücreler bulundukları ortamda çeşitli değişikliklere maruz kalırlar.

- 1) Su kaybı gerçekleşir, sonuç olarak solütler daha konsantre hale gelir ve çökelirler.
- 2) Bu sırada hücreler su kaybederek büzülürler ve osmotik cevap şekillenmiş olur (Luster 2004).

Kriyoprezervasyonda KPA'ların buz oluşumunu önleyici etkilerinden en üst düzeyde yararlanıp toksik ve ozmotik hasarı en aza düşürmek için optimal bir ortam oluşturulmalıdır. Geçmiş yıllarda KPA'ların biyolojik, fiziki ve kimyasal faktörlerinin analizini içeren önemli matematiksel hesaplara rağmen sadece sınırlı bir başarı elde edilebilmiştir. Kronolojik olarak ilk dondurma metodu kontrollü yavaş dondurmadır. Yavaş dondurmada soğutma yavaş bir şekilde gerçekleşir. Toksik ve osmotik hasar minimaldir. Sitoplazmada ve çevresinde KPA konsantrasyonunun yavaş bir şekilde artması sebebiyle buz oluşumu indüklenir. Bu artan konsantrasyon, sıcaklık düşüşü ile paralel gerçekleşir ve hücreye zararı azdır (Vajta ve ark 2007).

#### **1.4. Memeli Gamet Ve Embriyo Kriyoprezervasyonu Çeşitleri**

##### **1.4.1. Yavaş Dondurma**

Yavaş dondurma tekniği genellikle embriyo ve oosit dondurulmasında kullanılmaktadır ve en çok tercih edilen yöntemdir. Çok sayıda modifikasyonu bulunması ile birlikte, şu basamakları içermektedir;

- 1- Hücrelerin toplanması,
- 2- KPA'nın eklenmesi,
- 3- Dondurma malzemelerinin içine hücrelerin yerleştirilmesi,
- 4- Malzemelerin dondurma makinesine alınması,
- 5- Kristalizasyonun uyarılması,
- 6- Yavaş soğutma,
- 7- Sıvı azot içinde saklama,
- 8- Örneklerin çözülmesi ve KPA'nın uzaklaştırılması (Shaw ve ark 2000).

Buz oluşumunu önlemek ve neden olacağı hasarı azaltmak amacıyla önce hücreler dehidre edilmektedir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda KPA içeren solüsyonlar kullanılmaktadır (Shaw ve ark 2000).

Yavaş dondurmada, soğutma hızını ayarlayabilmek için kontrollü dondurma denilen bir yöntem uygulanmaktadır. Dakikada istenilen miktarda sıcaklık düşüşü çeşitli otomatik cihazlarla sağlanmaktadır. Soğutma oranı saptanırken genelde 3 parametre dikkate alınır;

- a) Membranın yapısı,
- b) Membranın suya ve KPA'ya karşı ısıya bağımlı olarak permeabilitesi,
- c) Yüzey/hacim oranı (Ağca 2000).

Yavaş dondurma tekniğinde biyolojik yapılarda iki tip hasar meydana gelme riski vardır. Bunlardan birisi soğutmanın yavaş yapılmasına bağlı olarak oluşan hücre içinde buz oluşumudur. Diğerisi ise buz kristalleri oluşumuna bağlı olarak meydana gelen eriyik konsantrasyonunun yükselmesidir (Gao ve Critser 2000).

### **1.4.2. Hızlı Dondurma**

İlk olarak Trounson ve Sjoblom tarafından yapılmıştır. Hızlı dondurma terimi, kısmen dehidre edilmiş hücrelerin yaklaşık 1 250°C/dk hızında soğutularak dondurulmasını ifade etmektedir. Bu yöntemde, genellikle 2-4,5M konsantrasyonlarda permeabl (hücre zarını geçebilen) Gliserol, Propandiol (PrOH), dimetilsülfoksit (DMSO) veya Etilen glikol (EG) gibi bir KPA ile beraber nonpermeabl (hücre zarını geçemeyen) süktroz, laktoz veya galaktoz gibi KPA'lar birlikte kullanılmaktadır. 30sn ile 3dk arasında kısa bir dengeleme sürecinden sonra soğutulan hücreler, sıvı azot buharına tutulduktan sonra, sıvı azota daldırılmaktadır. Vitrifikasyonun aksine, bu teknikte ekstrasellüler sıvıda, buz kristalleri oluşumu meydana gelmektedir. Ayrıca hücre içi sıvıda da buz oluşumu riski bulunduğundan diğer yöntemlere göre daha düşük canlılık oranları vermektedir. Bu teknik diğer dondurma yöntemleri kadar ilgi görmemiştir (Trounson 1990).

### **1.4.3. Vitrifikasyon**

Üreme fizyolojisi alanında gamet ve embriyoların kriyoprezervasyonunda geniş çalışmalar yapılmıştır. İlk çalışmalar spermatozoanın kriyoprezervasyonudur. Destek olarak polivinilpirrolidon (PVP), hidroksietil starch (HES), Ficoll ve polietilen glikol (PEG) içeren büyük moleköl ağırlıklı komponentler kullanılmıştır. Bu bileşiklerin bir solüsyonda tek başına kullanıldıklarında hücreyi koruyamamasına rağmen, diğer düşük moleköl ağırlıklı KPA'ların koruyucu etkilerini arttırmışlardır. Ardışık bölünme (cleavage) basamağındaki embriyoların kriyoprezervasyon prosedürünün başarısına rağmen, oositlerin kriyoprezervasyonunun çok daha zor olduğu

kanıtlanmıştır. Oositlerin boyutları geniş olduğu için düşük yüzey alanı, yüksek su içeriği ve farklı geçirgenlik özelliklerine sahip olduklarından kriyoprezervasyonları zordur. Bu durum kriyoprezervasyon çeşidi olan yavaş soğutmaya bir alternatif olarak oositlerin vitrifikasyon araştırmalarının artmasına öncülük etmiştir (Luster 2004). Vitrifikasyon insan oositlerinin korunmasında gelecek için en ümit verici durumlardan biridir. Memeli gamet ve zigotlarının uzun süre saklanması 25 yılı aşkın süredir büyük ölçüde geliştirilmiştir ve insan üreme tıbbında çeşitli yardımcı üreme tekniklerini desteklemek için kullanılmaktadır (Saki ve Dezfily 2005, Babaei ve ark 2007).

Vitrifikasyon, bir sıvının donmadan aşırı soğutulması nedeniyle cam benzeri bir hal alması şeklinde tanımlanmaktadır. En önemli özelliği, buz oluşumunun önüne geçilmesidir (Chang ve ark 2008). Dondurulacak hücreler, KPA solüsyonlarında çok kısa bir süre bekletildikten sonra (30-180sn) bunu takiben sıvı azot sıcaklığına (-196 °C) geçiş yapılmaktadır. Bu yöntemde genellikle geçirgen özellikli bir KPA ile geçirgen olmayan özellikteki bir KPA birlikte kullanılmaktadır (Çetin 2004). Vitrifikasyon prosedüründe KPA'ların toksik etkilerini önlemenin yolu, yüksek konsantrasyonlu KPA'ya maruz bırakma süresinin kısaltılması ya da daha düşük KPA konsantrasyonu kullanarak equilibasyon periyodunun arttırılmasıdır. (Martins ve ark 2005).

Başarılı bir vitrifikasyon işlemi,

- İyi permeabilite özelliklerine sahip düşük toksisiteli KPA kullanımını,
- KPA'ların uygun miktarda ortama eklenmesini,
- Hücre dondurma işleminin düşük sıcaklıklarda yapılmasını,
- Hücrede oluşacak yapı yıkımlarını engellemek için ortam düzenleyicilerinin kullanılmasını gerektirmektedir (Kasai 1996).

Vitrifikasyonda soğutma hızlı bir şekilde yapıldığından soğuk hasarının oluşabileceği  $+15^{\circ}\text{C}$  ile  $-5^{\circ}\text{C}$  arası sıcaklıklar çok hızlı (1/100sn hızında) geçilmektedir. Tekniğin en önemli özelliği, buz kristali oluşumunun elimine edilmesidir (Saki ve Dezfily 2005).

Vitrifikasyonun evcil hayvanların embriyolarını dondurmak amacıyla ilk defa kullanılmasından bu yana, 20 yıllık bir süre geçmiştir. Bu olgunun gerçekleşebilmesi, yüksek konsantrasyonda KPA'yı, yüksek soğutma ve ısıtma oranlarını, intraselüler ve ekstraselüler ortamların eş zamanlı olarak vitrifiye olmasını gerektirmektedir. Zamanla yoğunlaştırılmış polimerlerin KPA olarak kullanılması toksisite riskini düşürmüş, soğuma ve ısıtma oranlarındaki önemli artışlar, daha az konsantre solüsyonların kullanımına yol açmış ve hücrelerdeki soğuk hasarının etkisini düşürmüştür (Sutton 1991a, Sutton 1991b, Vajta 2000). Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri de, yavaş dondurmaya göre çok az zaman harcanmasıdır. Ayrıca pahalı ekipmanlara da gerek duyulmamasıdır (Babaei ve ark 2007).

### **1.5. Vitrifikasyon Solüsyonlarının Seçimi**

Vitrifikasyon, normal kimyasal reaksiyonların meydana geldiği sıcaklıkların altına düşülmesi ile hücre ya da dokuların buz kristali oluşmadan normal fonksiyonlarının başarılı bir şekilde korunmasıdır. Bu sıcaklıklarda hücreler hasarlandığı için çok uzun süre saklanamaz. Hücrelerin doğal olarak aşırı soğuklarda bulundurulması ve normal sıcaklıklara tekrar geri dönmesi soğuk hasarı ile sonuçlanır. Kriyoprezervasyon, dondurma işlemi sırasında hücreleri korumak için bir ya da daha fazla KPA kullanımını gerektirir (Mullen 2007).

KPA'nın keşfi ve modern kriyobiyojinin doğumu kısa bir geçmişe sahiptir. KPA'lar çeşitli bilim disiplinlerinde hücre ve dokuların uzun süre saklanması önemli ölçüde etkilidir. Oosit ve embriyonun vitrifikasyonunda esas gerekenler yüksek konsantrasyonlu KPA ile bu konsantrasyonun nontoksik olması ve hızlı bir soğutulma oranıdır. Kullanılan KPA türü, amaca bağlı olarak değişir. Gliserol, DMSO ve EG başlıca kullanılan KPA'lardır. Böylece oosit ve embriyo vitrifikasyonu için uygun olan bir KPA, soğutulma sırasında optimal konsantrasyonlarda oosit ve embriyoyu vitrifiye eder. Permeabilite oranı sıcaklığa bağlı olarak değişirse de optimal sıcaklıklar konsantrasyona bağlı olarak değişiklik gösterir (Ali ve Shelton 2007). Alkol, amin, şeker ve proteinler gibi birçok kimyasallar donma-çözme sırasında hücre ve dokuları hasara karşı korurlar (Elbarbary 2004).

Memeli hücreleri tuz solüsyonlarında soğutulup dondurulduğu zaman kaçınılmaz surette hasarlanır ve parçalanır. İlk keşiflerden beri düşük molekül ağırlıklı birçok bileşiğin soğuk hasarına karşı hücreleri koruduğu bilinmektedir. Bu bileşikler günümüzdeki KPA'lardır. Bu kriyoprotektif katkı maddeleri daha düşük donma noktasına ulaşmak için vitrifikasyon solüsyonlarına eklenirler (Luster 2004).

KPA'ların su ile hidrojen bağları oluşturup buz kristallerinin ebatlarını küçültme özellikleri KPA'lar arasında yaygındır. KPA uygulaması, çözünmüş KPA solüsyonlarında hücreleri basitçe inkübe ederek yapılır. Bu karşılaşmadan sonra hücreler -196°C seviyesindeki sıcaklıklara getirilirler ve akabinde sıvı azotta saklanır (Porcu 2001, Mullen 2007).

KPA'ların esas özellikleri şöyledir:

- Tipik olarak kimyasal yapıları kompleks değildir.
- Suda yüksek çözünebilirlik özellikleri vardır.
- Hızlı penetre olurlar ve yüksek konsantrasyonlarda osmotik hasarı azaltırlar (Elbarbary 2004, Mullen 2007).

Vitrifikasyon solüsyonunu seçerken dondurmanın biyofiziksel prensiplerinin bilinmesi önemlidir. KPA'nın sitotoksitedeki rolü ve sıcaklığın etkisi, çeşitli intrasellüler biyomoleküller, organeller, sitoskeleton yapıları ve KPA ile ilişkileri, KPA'ların vitrifikasyonu destekleyen ve/veya hücreyi soğuk hasarına karşı koruyan (serum proteinler) diğer destek KPA'lar ile ilişkisi iyi bilinmelidir. Dehidrasyon, dondurma-çözme ve rehidrasyon sırasında hücre içindeki fizikokimyasal etkileşimlerin ve bunların özelliklerinin bilinmesi vitrifikasyon solüsyonlarının hazırlanmasında önemli ölçüde etkilidir (Ali ve Shelton 2007).

Vitrifikasyon yöntemi için seçilen solüsyonlar ile ilgili çeşitli yaklaşımlar vardır:

- 1) Kullanılan KPA'lar vitrifikasyona elverişli kimyasal saflıkta seçilmelidir.
- 2) Çözme ya da dondurma sırasında buz kristali ya da herhangi bir hasar oluşturmamalıdır.
- 3) Donma noktasını düşürmek için suda çözünmelidir.
- 4) Osmotik gradienti minimize etmek için yüksek permeabilite özelliği olmalıdır. (Elbarbary 2004, Mullen 2007).
- 5) 2 ya da daha fazla KPA birlikte kullanılmalıdır (permeabl ve nonpermeabl).
- 6) KPA'lar hücreler için nontoksik olmalıdır. Sıcaklığa bağlı toksisite değerleri değiştiği için seçilen KPA'larda da dikkatli olunmalıdır (Elbarbary 2004, Ali ve Shelton 2007, Vajta ve ark 2007).

Vitrifikasyon sırasında hücresel tepkilerin bağlı olduğu faktörler:

1. Hücre hacmi ve yüzey alanı,
2. Suya karşı plazma membran geçirgenliğinin yeterliliği,
3. KPA'ların aktivasyon enerjisi (farklı sıcaklıklarda hücre membranından geçen KPA'ların permeabilitesini ifade eder),
4. KPA'nın tipi ve konsantrasyonu,
5. Soğutma hızı (Wetzels 1996).

Örneğin, spermelerde yüzey alanı/hacim oranı embriyo ya da oosite oranla daha yüksektir ve daha fazla su geçirgenlik katsayısı vardır. Bu yüzden aşırı soğuklara daha hızlı ulaşmak mümkündür. Soğutma hızının hücrenin çapıyla da ilişkisi bulunmaktadır. Hücre çapındaki artış soğutma hızında azalmaya yol açar. Bu sebeple oositlerin dondurulması çok düşük ısılarda olmaktadır (Wetzels 1996).

#### **1.5.1. Kriyoprotektif Ajanların Çeşitleri**

KPA'lar 2 ana gruba ayrılır. Permeabl ve nonpermeabl KPA. Vitrifikasyon solüsyonlarında bu 2 KPA da kullanılır. Vitrifikasyonda bugüne kadar kullanılan KPA'lar ilk önce embriyonun geleneksel yavaş dondurulmasında kullanılmıştır. Vitrifikasyon solüsyonlarının çeşitli tipleri vardır. Yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) kullanılan vitrifikasyon solüsyonları 2 ana KPA'dan oluşur. Birden fazla KPA'nın kullanılmasının amacı, vitrifikasyon sıvısındaki konsantrasyonu düşürmektir. Konsantrasyonun düşmesi vitrifikasyon solüsyonlarının toksisitesini azaltmak için bir stratejidir. 3, 4 ya da daha fazla KPA içeren vitrifikasyon solüsyonlarının kullanımı azdır. Yapılan

araştırmalar 3, 4 ya da daha fazla KPA içeren vitrifikasyon solüsyonlarının kullanımının 2 tip KPA kullanımından daha etkili ve daha az toksik olduğunu göstermektedir (Ali ve Shelton 2007).

### **Permeabl Kriyoprotektif Ajanlar**

Permeabl özelliğe sahip KPA'lar olarak, en yaygın kullanılanları DMSO, Gliserol, EG ve PrOH'dır. Bu KPA'ların molekl ağırlıkları sırasıyla 78,13; 92,10; 62,07; 76,10 gram/mol şeklindedir. Bu tür KPA'lar etkilerini, hücre zarından içeriye girip koligatif (bağlaşık) olarak göstermektedir. Koruyucu etkileri; donma sırasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların meydana getirdiği ozmotik büzülmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır. Permeabl KPA'lar buz kristallerinin oluşumunu -40°C kadar düşürebilmekte ve hücre, solüsyonların zararlı etkilerinden korunabilmektedir. Permeabl KPA'ların hücre içine geçişleri; solüsyonun kendi geçiş gücü, hücre içi ve dışındaki KPA'ların konsantrasyon farkı, ısı ve hücre yüzeyi ile orantılıdır (Leeuw ve ark 1993, Palasz ve Mapletoft 1996, Wetzels 1996, Leibo ve Brandley 1999, McGann 1999).

Araştırmacılar 0,5mol/L'den 6,0mol/L'ye kadar değişik molaritelerde denemeler yapmışlardır. Yüksek molekl ağırlıklı polimerler, ficoll, dextroz ve PVP %5-20 konsantrasyonlarında kullanılmıştır (Ali ve Shelton 2007). KPA'ların içinde en az toksik etkiye sahip olan EG'dir. Azdan oğa doğru toksisite sıralaması şu şekildedir:

- 1- EG
- 2- Metanol

- 3- DMSO
- 4- Gliserol
- 5- PrOH
- 6- Bütlen glikol (Ali ve Shelton 2007).

Etilen glikol su, alkol ve asetonla karışabilen ancak eterde hemen hiç çözünmeyen, renksiz, visköz ve tatlı bir alkoldür. Donma noktası  $-13^{\circ}\text{C}$ , kaynama noktası ise  $198^{\circ}\text{C}$ 'dir. Birçok türün spermasında donma-çözme sırasında oluşan zarara karşı etilen glikol, gliserolle eşit oranda etki sağlamaktadır (Aydiner 2008).

Metanol düşük toksisiteye sahiptir. Fakat çok yüksek konsantrasyonlarda bile vitrifiye etmez. Bu yüzden vitrifikasyonda tercih edilmez (Ali ve Shelton 2007).

DMSO, kimyasal olarak bir polar kök çevresinde iki apolar baştan oluşan amfipatik bir bileşiktir. Bu özellik ona hem sıvı hem de organik medyumlarda çözünme olanağı sağlamaktadır (Massip 2001). DMSO camısı görünüm oluşturma yeteneği, permeabilitesi ve düşük toksisitesinden dolayı vitrifikasyon solüsyonlarının esas komponentidir. KPA karışımına asetamid eklenmesi DMSO'nun toksisitesini düşürür. Aynı zamanda DMSO'nun varlığı da asetamidin zararlı etkilerini azaltır. Dekstroz proteinlere irreversibl bağlanarak DMSO'nun toksisitesini nötralize eder (Elbarbary 2004).

Gliserol, yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir bileşiktir. Gliserolün toksik etkisi türe bağımlılık göstermektedir. Bu toksik etki, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese yol açmasıyla kendini göstermektedir (Katkov ve ark 1998, Woods 2000, Alvarenga ve ark 2000).

Gliserol 1959'da Lovelock ve Bishop tarafından keşfedilen DMSO'nun koruyucu etkisine kadar KPA olarak kullanılmıştır (Luster 2004).

Propilen glikolde ise 3M'lık konsantrasyondaki propilen glikole 10dk maruz bırakılan embriyo toksik hasara uğrar. Propilen glikol vitrifikasyonda kullanılabilir, fakat son derece toksiktir (Ali ve Shelton 2007).

Bütilen glikol vitrifikasyonda kullanılan bir kimyasaldır. Ancak embriyo kriyoprezervasyonu için son derece toksiktir. Bunun için de kullanımı uygun değildir. Kullanılması halinde konsantrasyonu 1 mol/L'yi geçmemelidir (Ali ve Shelton 2007).

Hücre dondurma medyumundaki KPA'ların zararlı etkisini azaltmak için, hücrelerin KPA'lara maruz kalma süresinin azaltılması ve nonpermeabl KPA kullanımı gibi uygulamalar yapılmaktadır (Massip 2001).

### **Nonpermeabl Kriyoprotektif Ajanlar**

Nonpermeabl KPA'lar; membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranlarını esnek hale getirir. Bu olay da çözme esnasında ölümcül hücresel şişmeyi engeller. Ayrıca hücrede, donma-çözme sırasında gelişen peroksidasyonu azaltmaya çalışırlar. Permeabl KPA'lara ilave edilen sıvılar düşük oranda kullanılmakta, bu da permeabl KPA'ların olası toksik etkilerini osmotik basınç farklılıkları oluşturarak azaltmaktadır (Arav ve ark 1993, Cabria ve ark 2001).

Nonpermeabl KPA'lar, makromoleküller ve sakkaritler olmak üzere ikiye ayrılır:

Makromoleküllerden en çok kullanılanları şunlardır: Polietilen glikol, ficoll, Bovine serum albumin (BSA), dekstran, mannitol ve PVP'dir. BSA'nın lipit peroksidasyon inhibitörü olduğu zannedilmektedir (Kasai 1996, McGann 1999, Cabria ve ark 2001).

Sakkaritlerden glukoz, sükroz ve disakkaritler sayılabilir. Disakkaritlerden sükroz ve trehaloz en yaygın kullanılan nonpermeabl KPA'lardır. Sükroz bir dengeleyici olarak görev yapar. EG'nin yüksek konsantrasyonunun etkilerini minimize eder. Trehaloz ise doğrudan membran lipit ve proteinlerinde görev alır. Onların yapısını değiştirir. ve membran yüzeyindeki su moleküllerinin yerini değiştirir. Böylece dehidrasyon sırasında protein denatürasyonunu ve agregasyonunu inhibe eder (Martins ve ark 2005). Sakkaritler, lethal etkili intrasellüler buz kristali oluşumunu engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar (Rudolph ve Crowe 1985, An ve ark 2000). Şekerler, donma ve çözme sırasında meydana gelen membran hasarına karşı membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak korumaktadırlar. Çözme işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir (McGann 1999).

Serum proteinleri, membran bütünlüğünü sağlamak için isoosmoliteyi sağlarlar ve KPA'nın pH'sının devamlılığı için tampon görevi görürler. Bu bilgiler ışığında vitrifikasyon için molar konsantrasyon ve düşük toksisitenin gerekli olduğu kanıtlanmıştır ve bu EG kullanılarak başarılmıştır. Vitrifikasyon sırasında hücre, suyun hızlı bir şekilde dışarı çıkması ile birlikte yüksek osmolar KPA'ya maruz kalınca dehidrate olur ve büzülür. Yüksek osmolar KPA'ya maruz kaldıktan sonraki hacmin düşmesi %85-%88 oranındadır. Su, makromoleküllerden 5 000 kat daha hızlı olarak hücreyi terk eder ve diğer

maddeler sitoplazmada kalır. Bunun sonucu olarak intrasellüler madde konsantrasyonu artar (Ali ve Shelton 2007).

Hücrelerin başarılı bir şekilde dondurulması, plazma membranından suyun ve KPA'ların basit difüzyonunu ve hızlı transportunu gerektirir. Son zamanlarda membransel transportta görevli protein yapısında olan su kanalları (aquaporin) saptanmıştır. Bu proteinlerin dondurma sıvısına eklenmesiyle hücrenin canlılık gücü artırılmaktadır (Edashige ve ark 2003).

#### **1.6. Vitrifikasyon İşleminde (Donma-Çözme) Şekillenen Olaylar**

Dondurulma sırasında hücrede oluşabilecek değişiklikleri maddelersek;

1.Çözücüler ve tuz solüsyonları sıvı fakat vizkozitesi yüksek fazdayken; su, buz kristallerine dönüşür, sıvı fazdan katı hale geçer. Sıcaklığın düşmesi ile meydana gelen buz kristalleri, iç hücre sistemini koruyan hücre membranlarında büyük hasarlar oluşturabilir.

2. Sıcaklığın düşmesi sonucu suyun buz kristalleri meydana getirmesi sebebiyle geride kalan tuz solüsyonları ekstrasellüler ortamdaki çözücülük etkilerini gittikçe azaltır. Su-tuz-buz karışımı kristalize olduğu anda buna ötektik noktaları denir. Tuz bileşenleri, ötektik noktalarına suyun kristalleşmesi ile ulaşır. Bu değerler normal kültür solüsyonları için -10°C ile -17°C arası, sodyum klorid için ise -25°C'dir. Bu sebeple KPA'ların yokluğu durumunda ölüm oranları artacak, hücreler yüksek oranlarda pH değişikliklerine ve farklı konsantrasyonlarda tuzların etkisine maruz kalacaktır. Bu durum lipoprotein denatürasyonu ve buna bağlı membran içinde zorlanmalara neden olur ve bu da solüsyon etkisi olarak açıklanabilir.

3. Dondurma solüsyonu içindeki tuz konsantrasyonunun yükselmesi ile birlikte hücre ozmotik hale geçer ve su kaybeder, bunu takiben pasif dehidrasyon olur ve hücre büzüşmeye başlar. Hücre yoğunluğundaki azalmanın çok olması hücre yapısında dönüşümsüz hasarlara yol açarak hücrenin ölümüne sebep olur.

4. Soğuk Hasarı: Gametlerdeki soğuk hasarı; hiperozmotik stres, soğuk şoku stresi, ozmotik büzüşme-şişme sonucu oluşmaktadır. Hiperozmotik çevrenin oluşmasında ortam pH'sı, sellüler dehidrasyonda artış, hücre membranı protein-lipit kompleksinin zayıflaması önemli yer tutar. Donma esnasında, oosit ve embriyoda oluşan koyu lipit damlacıklarının soğuk şoku hasarıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Soğutma hızı artıkcı intrasellüler buz oluşumu da artacaktır (Gao ve ark 1993).

Hücrenin hacim ve membran yapısına göre kullanılan KPA'lerden bağımsız olarak her hücrenin sahip olduğu optimum bir soğutulma hızı vardır. Hücre içinde buz oluşturmıyacak en hızlı soğutulmaya, "optimum soğutulma hızı" adı verilir. Bununla birlikte birçok hücre tipi için değışik optimum soğutulma hızları vardır. İn vitro fertilizasyon (IVF) için önemli olan bazı hücrelerde ise hala kesin optimum bir değer ortaya konulamamıştır (Wetzels 1996).

KPA'lar genellikle -15°C'nin altındaki sıcaklıklarda buz oluşturlar. Bu olay aşırı soğuma (supercooling) olarak adlandırılır. Aşırı soğuma, bir sıvının sıvı fazdan katı faza geçmeden normal donma noktasının altındaki bir sıcaklığa soğumasıdır. Bu yarı kararlı durumdaki sıvının partikülleri enerjilerini kaybeder ancak katı kristal durumuna geçemezler. Bu sırada şayet sıvıya

küçük bir kristal ile seeding yapılırsa kristalleşme oluşacak ve sıcaklık donma noktasına geri dönecektir. Kristalleşme; ortamdaki toz zerrecikleri, mekanik titreşim ya da sert yüzeyler ile de indüklenebilir (Woods ve ark 2000).

KPA ilavesini takiben, hücreler bir dengeleme sürecine bırakılırlar ve bu sırada hücreler, su kaybetmeye başlarlar. Su kaybının sebebi, ekstrasellüler ortamın hiperozmotikliği ve hücre zarının KPA'ya göre suya daha geçirgen olmasından kaynaklanmaktadır. Hücre dışına su çıkışı ve hücre içine KPA girişi dengeye ulaştığında hücre büzülmesi durmaktadır. Çoğu KPA hücre içine giriş hızına karşın, suyun hücreden çıkış hızı kadar bir hızla hücre içine giremediklerinden, hücrede dehidrasyona ve büzüşmeye sebep olurlar. Bu olay KPA'nın dilüsyonu sırasında tersine dönmektedir. Dilüsyon medyumundaki su, hücre içine hızlı bir şekilde girerken, hücre içindeki KPA aynı hızla dışarıya çıkamamaktadır. Sonuçta, hücrede şişme meydana gelmektedir. Bunu engellemek amacıyla dilüsyon medyumlarına, hücre zarını geçemeyen sükroz eklenmektedir. Sükroz, suyun hücre içine girişini yavaşlatarak hücrenin birden şişmesine ve ozmotik bir şok yaşamasına engel olmaktadır (Mullen 2007).

Fare oositlerinde yapılan çalışmalar intrasellüler buz kristallerinin oluşmaması için, su içeriğinin %90'ının kaybedilmesi gerektiğini göstermektedir. Halbuki embriyo için %30'luk bir oran yeterli olmaktadır (Friedler ve ark 1988).

### **1.7. Oosit Kriyoprezervasyonunun Tarihçesi ve Nedenleri**

Üreme hücrelerinin kriyoprezervasyonu ilk olarak 1776'da sperm dondurulmasının Spallazani tarafından rapor edilmesiyle başlamıştır. KPA ile

yavaş soğutmanın kullanımı, hücresel kriyoprezervasyonda çözme sonrası canlılıktaki gelişmelere önderlik etmiştir. Fare embriyolarının başarılı bir şekilde dondurulması ilk olarak 1972’de kanıtlanmıştır (Whittingham ve ark 1972). Devam eden araştırmalar %90’dan fazla oranlarda canlılık elde ederek çözme sonrası viabiliteyi önemli ölçüde geliştirmiştir, diğer yandan oosit kriyoprezervasyonunun başarısı daha azdır (Mullen 2007).

Cinsiyete dayalı ayrımların kabul edilebilirliğinin toplumda gittikçe azalmasına rağmen, özellikle üreme dahil olmak üzere belli alanlarda kadın ve erkek arasında güçlü ayrımlar vardır. Çoğu memelide üreme siklusu, gebelik, doğum sancısı, bebek bakımı ile ilgili zorlukları içeren reproduktif sıkıntıların çoğunu kadın üstlenir. İnsanlarda en iyi niyetlere rağmen erkekler bu sıkıntıların çoğunu üstlenmezler ve çoğu kadın onları yaşamlarının kaçınılmaz bir parçası olarak kabullenmişlerdir. Ayrıca bunlara ek olarak kadın ve erkek arasında genetik materyalin korunması ve gelecek kuşaklara aktarılması hakkında daha can sıkıcı farklılıklar vardır. Oositin sayısı son derece sınırlı iken sağlıklı bir erkek hergün milyonlarca sperm üretir. İnsanda dahil çoğu memelide ayda 1 ya da 2 oosit gelişir. Dahası kadın için üreme çağı sınırlı iken erkekler tüm hayatları boyunca üreme yeteneklerini korurlar. Teorik olarak kadının gebe kalması ve bebek sahibi olması menopoz öncesi gerçekleşen olaylardır. Fakat pratikte bu periyod oositin kalitesinin 35 yaşından sonra düşmesiyle kısalır (Kuwayama ve ark 2007).

Çoğu birey için bir aileye sahip olmak onların kendilerini hissetmelerini ve toplumda bir yer edinmelerini tanımlar. Ayrıca insanlardaki bir çocuk sahibi olma arzusu duygusal dürtülerinin en güçlülerinden biridir. Ne yazık ki üretken yaşlardaki çoğu çift (tahmini olarak %40’dan fazlası) medikal bir

tedavi uygulamadıkları sürece infertildir. Çoğu birey için infertilite çok ciddi bir yaşamsal krizdir (Menning 1980, Alesi 2005).

Kadınlar infertiliteyi şimdiye kadar karşılaştıkları en kötü kriz olarak tanımlarlar. Depresyon ve anksiyete, öfke, üzüntü, hayalkırıklığı ve suçluluk duygusu gibi hisler infertil kişilerde sık sık hissedilir. Yardımcı Üreme Teknoloji Derneği ve Amerikan Üreme Tıbbı Derneği Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri ile birlikte insan yardımcı üreme teknolojisinde gerçekleştirilen aktiviteleri içeren yıllık istatistikleri toplamışlardır. 2002 yılında yaklaşık olarak 86 000 YÜT tedavi siklusu başlatılmıştır. 14 000'nin üzerinde hastaya kriyoprezerve embriyo transferi gerçekleştirilmiştir. Bu kriyoprezerve embriyolardan yaklaşık 3 500 doğum rapor edilmiştir ve 41-42 yaşlarındaki kadınlarda %17, 35 yaşın altındaki kadınlarda %28 oranlarında değişen canlı doğum oranları vardır. taze embriyo transferi yoluyla canlı doğum oranları yaş gruplarına göre değişmekle birlikte %43'den %15'e kadar değişmektedir. 25 Avrupa ülkesi tarafından yapılan benzer bir bildiri de 2002'de tamamlanmıştır (Andersen ve ark 2006). Bu raporda 631 klinikte başlatılan yaklaşık 325 000 siklus belgelenmiştir. 13 ülkede 175 000'den fazla siklus rapor edilmiştir ve IVF için klinik gebelik oranları ve intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) yaklaşık olarak %30'dur. Doğum oranları ~10'dan >%30'a kadar değişmektedir. IVF bir tedavi seçeneği olarak kullanıldığı zaman bir seri müdahaleden yararlanır. İlk olarak kadınların menstrual siklusu, fertilizasyon için kullanılabilir oosit sayısını arttırmak için hormon verilerek kontrol edilir. Vakaların çoğunda birçok oosit başlangıçta toplanır. Korunan oositler için yeterli metodların eksikliği yüzünden bu IVF'e mecbur olan herkes için yaygındır. Bu da genellikle fazla embriyo oluşması ile sonuçlanır. Genellikle arta kalan sağlıklı görünümlü embriyolar ilk transfer başarısızlığından sonra bir dahaki transfere kullanılmak üzere dondurulup saklanırlar. Bu

uygulamanın bir sonucu olarak kriyosaklamada insan preimplantasyon embriyo sayısının yüzbinlerde olduğu tahmin edilmektedir (Hoffman ve ark 2003, Benagiano ve Gianaroli 2004).

### **1.7.1. Dondurulma Sürecinde Oosit Zarı ve Mikrotübüler Etkileşim**

Olgun bir oosit, memelilerdeki en büyük hücrelerden biridir. Farede yaklaşık 70µm, insan, inek ve domuzda yaklaşık 120µm çapındadır. Omurgalıların çoğunda oositler ovulasyona yakın bir süreçte 2. mayoz bölünmelerini geçirirler ve fertilizasyona kadar bu mayotik süreç durur. Bu evrede kromozomlar kondansedir ve iğ ipliklerinin metafaz plağı üzerine yerleşmişlerdir. Genellikle memeli oositlerinin benzer olmasına rağmen (Pincus 1936), çözme sonrası canlılık için önemli belirleyiciler olduğu düşünülen bazı farklılıklar vardır (Parks ve Ruffing 1992).

Soğuma doğrudan hücrelerin plazma membranını etkiler, likit kristal fazdan jel fazına geçişte fosfolipit moleküllerinin termal enerjilerinin düşmesine sebep olur. Sonuç lipidlerle membranın fiziksel özellikleri arasındaki etkileşimlerin değişimidir. Bu geçiş sıcaklığı, belli türlerdeki hidrokarbon zincirlerinin uzunluğu, doymamış hidrokarbon zincirlerinin varlığı ve doymamışlık derecesi, soğuma oranları tipleri ve integral membran protein konsantrasyonu ve hücre çevresindeki solüsyonun kompozisyonu, KPA'nın varlığı gibi birçok faktör tarafından etkilenir. MII oositlerin faz değişim sıcaklığı bazı memeli türlerinde araştırılmıştır. Arav ve ark (1996) sığır oositlerindeki bu olayda ortalama 10°C'de çok geniş bir faz geçişi meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Membrandaki 2 tabakalı lipitteki kolesterolün varlığının faz geçişini genişlettiği bilinir (Mullen 2007).

Hücre membranında soğuk şokunun etkileri tanımlanarak kriyoprezervasyonun içeriğinde özellikle sperm için önemli bir kısım açıklığa kavuşmuştur (Morris ve Watson 1984, Watson ve Morris 1987).

Hücre membranında likit kristal modelinin bir çeşidi standart hücre biyolojisinde bulunmaktadır. Genelde amfipatik lipid moleküllerinin çeşitli integral proteinleri içeren 2 tabakalı bir yapısı vardır. Fizyolojik sıcaklıklarda akışkan bir durumdadır ve bu akışkanlık yüksek bir moleküler hareket sağlar. Lipit ve proteinlerin çoğu bu 2 tabaka içinde serbest olarak yayılırlar. 2 tabakanın zıt yüzleri aynı özelliğe sahip değildir ve tabakaların bir yüzünden diğer yüzüne hareket enerjik olarak mümkün değildir. Solüsyondaki lipit yapı bundan daha çeşitlidir. Lipitlerin dizilimi su aktivitesi, sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu ve diğer moleküllerle etkileşime bağlıdır. Membranlar soğutulduğu zaman termotropik davranışlar sergilerler. Bu davranışlar membranların faz geçişine uğramaya meğilli olduklarını gösterir. Membranlar soğutuldukça lipitler sıvı fazdan jel faza geçmeye meyilli olurlar. Moleküller de karakteristik hegzagonal bir düzenleme ile kristal hale geçerler. Biyolojik membranların karmaşık yapısı yüzünden; bu faz geçişi, saf bir solüsyonda kristalizasyon olayı gibi olmaz fakat farklı etki alanları içine doğru membran lipitlerinin yavaş bir şekilde lateral ayrılışı demek daha uygundur. Yine de bu geçiş normal bir lipit düzenlenmesinden farklı bir değişikliktir ve membran fonksiyonunda önemli etkilere sahip olabilir. Bu geçiş sırasında varolan sıcaklık lipitlerdeki hidrokarbon zincirlerinin uzunluğu, cis-doymamış bağların varlığı ve bulunduğu yer, solüsyon konsantrasyonu ve solüsyondaki katyonların değeri gibi özellikleri içeren birçok faktöre bağlıdır. Çok değerlikli katyonların konsantrasyonundaki artış faz geçiş sıcaklığını artırır. Halbuki tek değerlikli katyonlar lipit akışkanlığını artırır ve faz geçiş sıcaklığını

düşürür. Bir membranda kolesterolün varlığı faz geçişlerinin davranışını da etkiler. Bu etkiler;

- 1) Jel fazına geçmek için lipid türlerinin yeteneğini değiştirmek,
- 2) Jel fazı bozukluğunun artması (Mullen 2007).

Soğutulan matür memeli oositlerinin etkilerini araştıran çoğu çalışma soğüğün MII iğ ipliklerindeki etkilerini anlamaya yönlendirmiştir. İlk rapor fare oositleri kullanarak 1980'de açıklanmıştır. Bu çalışma 15, 30, 45 ya da 60dk buzda soğutmanın iğlerin progresif mikrotübül depolimerizasyonu ile sonuçlandığını göstermiştir. İğ ipliklerinin çoğu çok kısa bir soğutma işleminden sonra depolimerize olur ya da kutuplara uzanan fiberler tamamen depolimerize olmaya başlar ve kinetokor iğlerin çoğu depolimerize olur. Kinetokor mikrotübüllerinin yaklaşık tamamı 30dk'da depolimerize olur ve daha uzun işlemlere maruz bırakmak depolimerizasyon prosesini tamamlar (Magistrini ve Szöllösi 1980).

Farklı sıcaklıklarda hızlı çözme (18, 25 ya da 37°C'de 30dk), sıcaklığa bağlı repolimerizasyonun farklı dereceleri ve normal bir iğ yapısı ile sonuçlanır. 18°C'de repolimerizasyon meydana gelmez, 37°C'de çok az repolimerizasyon meydana gelir fakat tam bir repolimerizasyon 25°C'de gerçekleşir. Araştırmacılar progresif olarak çözme ile (18°C'de çözüp 25°C'ye transfer edip sonra da 37°C'ye aktararak) yeniden normal iğ yapısının oluştuğunu göstermişlerdir. Bu etkiler daha sonraki çalışmalarda kanıtlanmıştır. Daha sonraki çalışmalardaki farklılıklardan biri doğrudan 37°C'de çözme ile ooplazmada normal iğ yapısının yeniden oluşabileceğidir. Diğer bir farklılık iğ yapısının kendini tamir edebilme özelliğinin (çözme sonrası iğ ipliklerinin morfolojisinin soğuma öncesi morfolojiye benzer şekilde

olması) azalmasıdır. Çalışmaların çoğu iğ ipliklerinden farklı olarak kromozomların dağılmadığını göstermiştir fakat sıklıkla kümeleşme ve yer değişimi yaptıkları belirtilmiştir. Benzer etkiler sığır ve domuz oositlerinde de gösterilmiştir (Mullen 2007).

İntrasellüler suyun donması, dondurma sırasında hücre canlılığı ile çok güçlü bir korelasyona sahiptir. Oositlerin geniş hacmi ve sferikal şekli yüzünden (düşük yüzey-hacim oranı) memeli oositleri soğuma sırasında özellikle hücre içinde bulunan fazla miktardaki su yüzünden intrasellüler buz oluşumuna hassastır. İntrasellüler buz oluşumu ve hücre ölümü arasındaki ilişkileri açıklayan ilk deneylerin bazılarında oositler bir hücre modeli olarak kullanılmıştır (Leibo ve ark 1978).

Leibo ve ark (1978) yaptıkları çalışmada oositlerde intrasellüler buz oluşumu (hücresinin parlaklığı ya da aniden kararmasına göre yapılan değerlendirme) ve buzun oluştuğu sıcaklık ortamı oluşturulursa, insidansını gözlemlemek için bir kriyomikroskop altında  $-80^{\circ}\text{C}$  gibi düşük sıcaklıklarda 1M DMSO varlığında oositleri çeşitli oranlarda ( $\sim 1^{\circ}\text{C}$ 'den  $32^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ 'ya kadar ) soğutmuşlardır. İntrasellüler buz oluşum sıcaklığının donma oranları ile ilişkisinin az olduğu gösterilmiştir ve ortalama  $-40^{\circ}\text{C}$  gibi düşük bir sıcaklıkta meydana geldiği açıklanmıştır. Kümülatif canlılığın (buz oluşum insidansının ters orantısı olarak tanımlanmıştır) donma oranları ile güçlü bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir.  $1,3^{\circ}\text{C}$ 'de soğutulan oositlerin sadece %13'ünde intrasellüler buz oluşumu gerçekleşirken  $\sim 5^{\circ}\text{C}$  veya üzerindeki oranlar araştırılması yapılmış olan bütün hücrelerde intrasellüler buz oluşumu ile sonuçlanmıştır. Hücrelerin bazıları intrasellüler buz oluşumunu göstermeden önce yaklaşık  $-60^{\circ}\text{C}$  sıcaklıklara soğutulmuştur. Toner ve ark (1991) permeabl KPA yokluğunda fare oositlerinde intrasellüler buz oluşum parametrelerini görmek için

araştırmaları genişletmişlerdir. Onlar intrasellüler buz oluşumunun meydana geldiği sıcaklığın çok daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (~ -12°C).

Araştırmacıların tahminlerine göre heterojen buz oluşumu -31°C'nin üstündeki ve altındaki sıcaklıklardaki buz oluşumundaki farklılıklardan sorumludur. nceki buz oluşumları ekstrasellüler buz tarafından sonra da intrasellüler buz tarafından oluşturulur. Bu olay sabit sıcaklıklarda intrasellüler buz oluşumunu gösteren bir farklılığı kapsar. -20°C'deki sıcaklıklarda ekstrasellüler buzun varlığı, intrasellüler buzun varlığı için gereklidir. Hücreler bu noktadaki sıcaklıklara aşırı soğutulduğu zaman ve sonra hücre dışında spontan olarak buz oluştuğu zaman buz hemen hücre içinde de oluşmaya başlar (Toner ve ark 1991).

Mazur ve ark (2005) fare oositlerinde EG ve DMSO varlığında intrasellüler buz oluşumunun sıcaklıklarını araştırmışlardır. DMSO ya benzer olarak EG ve gliserol, permeabl bir KPA olmadan izotonik bir solüsyonda oositlerin buz oluşum sıcaklığını baskılar (Mazur ve ark 2005).

### **1.7.2. Oosit Kriyoprezervasyonunun Hücresel Komponentlere Etkileri**

Bazı permeabl KPA lara maruz bırakmanın memeli oositlerindeki etkileri araştırılmıştır. Johnson ve Pickering (1987) DMSO'ya maruz bırakmanın fare oositlerinin MII iğlerindeki mikrotübüllerinin neredeyse tamamının polimerizasyonunun değiştiğini göstermişlerdir. KPA'ya maruz bırakılmamış mikrotübüllerin normal yapısına nazaran 37°C'de 10-20dk 1,5 M konsantrasyondaki bir KPA'ya maruz bırakmak iğlerin u bölgelerindeki mikrotübüllerin yıldızsı görünüm sergilemesine sebep olur. Dahası mikrotübüllerin diğer sitoplazmik yıldızsı biçimleri, perisentrioler materyal

çevresinde toplanmıştır ve iğlerle ilişkili değildir. Bu örnek 4°C’de bekletilenlerdeki gibidir. 2 sonuçta da iğlerin tüm şekilleri korunmuştur. DMSO olmadan 4°C’ye maruz bırakmak beklendiği gibi iğlerin hızlı depolimerizasyonu ile ilişkilidir. Uzun süreli maruz bırakmak (4°C’ye transfer ettikten sonra ya da transfer etmeden 60dk) tübülün monomerleri ile birlikte iğ mikrotübüllerinin kaybolmasına sebep olur. Bu etkiler metafaz plağından kromozom çözülmelerine sebep olur. DMSO uzaklaştırıldıktan sonra iğlerin onarılması 37°C’de 30dk inkübasyon sonrası bazı oositlerde (işleme bağlı %56-60 arasında) meydana gelir fakat 4°C’de kalan oositlerde iğlerin hiçbirisi onarılmaz. Şayet tek basamak DMSO yerine çok basamaklı DMSO ilavesi yapılırsa çoğu oosit (%89) normal iğ yapısına kavuşabilir (Mullen 2007).

### **1.8. Oosit ve Embriyo Taşıyıcıları**

Vitrifikasyonda soğutma hızı oosit ve embriyoların içinde bulunduğu kriyoprotektan solüsyonun miktarıyla direkt ilişkilidir. Oositleri bulunduran kriyoprotektan solüsyonunun miktarı ne kadar az olursa, soğutma oranı da o ölçüde hızlı olacaktır (Chian ve ark 2004a). Embriyoların vitrifikasyonu ilk olarak 0,25ml’lik payetlerde yapılmışken, daha sonraları yüksek termal ileticiliği olan cam mikropipetlerde, Open Pulled Straw’larda (OPS) ve son yıllarda GL-tip (gel loading tip), Cryoloop ya da Cryotoplar içerisindeki mikrodamlalarda dondurulmaktadır. Çünkü vitrifikasyonda mümkün olan en küçük hacimde kullanılan vitrifikasyon solüsyonu içerisindeki oosit ya da embriyolar, yoğun KPA’lara çok kısa bir süre maruz kalırlar. Üstelik OPS, Cryoloop ya da Cryotop ile yapılan vitrifikasyonda kriyoprotektan solüsyonunun miktarı çok düşük olduğundan (0,5-2 µl), oosit ya da embriyolar 0,25ml’lik payetlerde yapılan vitrifikasyon işleminden çok daha hızlı dondurulmuş olur. Ayrıca küçük hacimlerde yapılan vitrifikasyon

işleminde sonra, oosit yada embriyonun rehidrasyonu çözündürme solüsyonuyla temastan hemen sonra meydana gelir ve böylece çözündürme işleminin toksik ve ozmotik etkileri bertaraf edilmiş olur (Uysal 2007).

## **2. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma 2009/074 no.lu etik kurul kararı gereğince Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne infertilite tanısıyla başvuran hastaların ICSI sonrası arta kalan oositleri ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya alınan hastaların hepsine uzun protokol (GnRH analogu ile down regülasyon) agonist tedavisi sonrası recFSH ve /veya HMG kullanılarak kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu uygulanmıştır. Foliküler matürasyon monitörize edilerek foliküller yeterli boyuta ulaştığında, human chorionic gonadotropin (hCG) uygulaması ile ovulasyon tetiklenmiştir. Takip eden folikül aspirasyonu ile matür oositler elde edilmiştir. Minimum 10-12 oosit için ICSI işlemi uygulanmıştır. Hastaya ait arta kalan işlem dışı oositler imha edilmeden vitrifikasyon modellemeleri için kullanılmıştır.

Bilgi onay formuyla (Bkz. EK-B) izinleri alınmış vakalara ait arta kalan toplam 112 oosit üzerinde çalışıldı. Kontrol grubu olarak aynı hastalara ait toplam 240 oosit sadece fertilizasyon amacıyla incelendi. Merkezimize başvuran hastalardan folikül aspirasyonu yapıldıktan sonra, oositleri kumulus-korona kompleksinden arındırmak için hiyalüronidaz enzimi ile muamele edildi. Temizlenen oositler kültür medyumunda içerisinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'de 2

saat bekletildi. Sonrasında oositler vitrifikasyon işlemine tabi tutuldu. Sıvı azot tankında 3 saat süreyle bekletildikten sonra çözme işlemi gerçekleştirildi.

Tüm çalışma boyunca sterilite koşullarına dikkat edilmiştir. Çalışma Cryologic vitrifikasyon seti (kriyo küveti, kriyoblok, azot transfer kabı, fibreplug ve kılıfı) ile gerçekleştirilmiştir (resim 2.2.).



**Resim 2.1.** Vitrifikasyon İşlemi İçin Cryologic Vitrifikasyon Set.

## **2.1. Vitrifikasyon İşlemi İçin Yapılan Ön Hazırlıklar**

### **2.1.1. Vitrifikasyon Solüsyonlarının Hazırlığı**

Vitrifikasyon işlemi için oda sıcaklığında laminar-flow altında 60mm'lik steril kültür kabı (Nunc) içerisine farklı yüzdelerdeki HEPES bazlı Human Serum Albumin (HSA) içerikli HTF medyumunu (HTF w/HEPES, LifeGlobal) ile hazırlanmış DMSO, EG ve Sükroz ilaveli dengeleme ve vitrifikasyon solüsyonları 75µl'lik dropletler halinde yerleştirilmiştir. Sonrasında mini etüvde yaklaşık 30dk sıcaklığın 35°C'ye gelmesi beklenmiştir (resim 2.1.).



**Resim 2.2.** Vitrifikasyon İşlemi İçin Hazırlanmış Kültür Kabı.

### 2.1.2. Soğuk Yüzey Hazırlığı

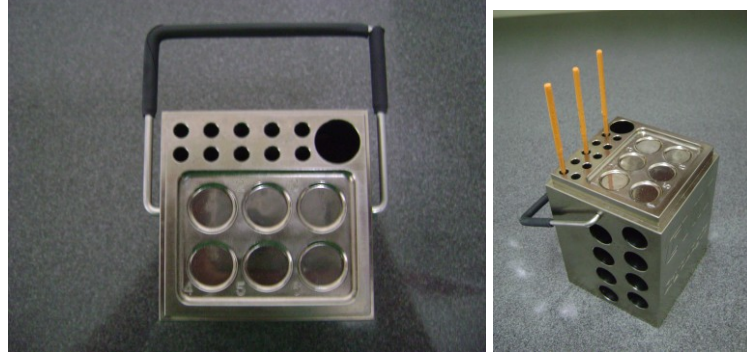
-196°C'deki sıvı azot, soğutma kabı (kriyo küvet) içerisine 7-8 lt hacimde eklenip kriyoküveti ve içerisine yerleştirilen bloğun soğuması sağlanmıştır. Sıvı azotun kaynaması kesildiğinde blok ve sıvı azot aynı derecededir. Kriyoküveti, kapağı kapatılıp işleme hazır hale getirilmiştir (resim 2.3.).



**Resim 2.3.** Kriyo Küvet İçerisinde Soğutulan Kriyoblok.

### 2.1.3. Taşıyıcıların Hazırlığı

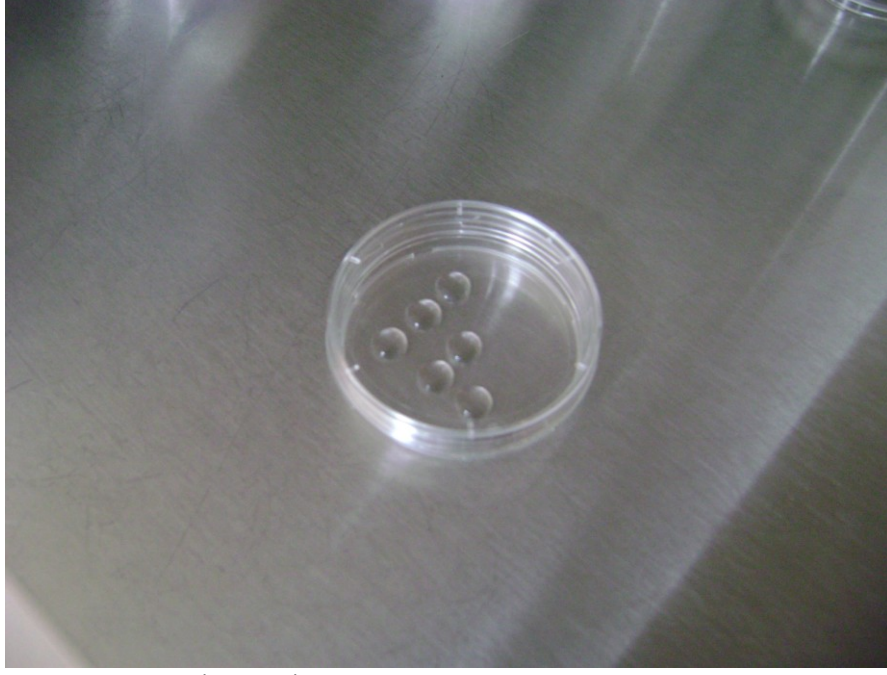
Gobletler isimlendirilip numaralandırıldıktan sonra içerisinde sıvı azot bulunan bir kaba bırakılıp soğumaları sağlanmıştır. Oositlerin yükleneceği fibreplug, isimlendirilip kılıfından çıkarılarak laminar flow altında işlem için bekletilmiştir. Kılıflar, kriyoküvet içerisindeki blokta bulunan haznelere yerleştirilerek soğumaları sağlanmıştır (resim 2.4.).



**Resim 2.4.** Vitrifikasyon İşleminin Yapıldığı Metal Alaşımdan Yapılmış Soğuk Blok Yüzey ve Haznelere Yerleştirilmiş Fibreplug ve Kılıfları.

#### **2.1.4. Çözme Solüsyonlarının Hazırlığı**

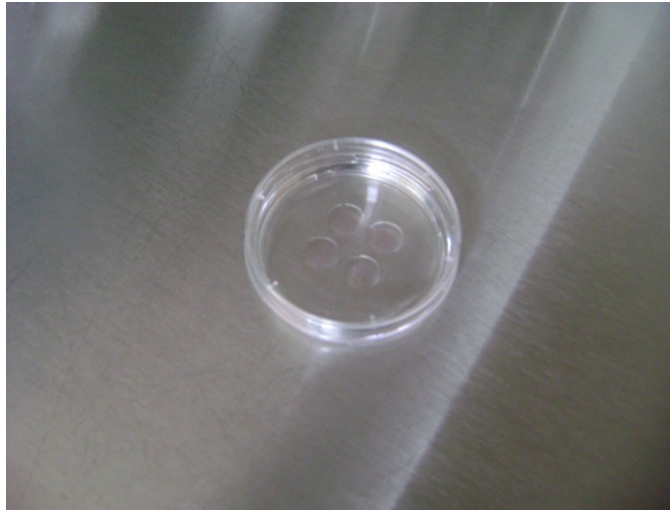
Çözme solüsyonları için laminar-flow altında 60mm'lik kültür kabı (Nunc) içerisine HEPES bazlı (HTF w/HEPES LifeGlobal) HSA içerikli değişen molaritelerdeki sükroz ilaveli solüsyonlar 75µl'lik dropletler halinde yerleştirilmiştir ve 37°C'ye gelmesi için 30dk mini etüve kaldırılmıştır (resim 2.5.).



**Resim 2.5.** Çözme İşlemi İçin Hazırlanmış 75 $\mu$ l'lik Değişen Molaritelerdeki Sükroz Solüsyonlarından Oluşan Kültür Kabı.

#### 2.1.5. İnkübasyon Solüsyonlarının Hazırlığı

İşlemden 1 gece önce %12 HSA içeren embriyo kültür medyumunu (Global, LifeGlobal) kültür kabı içerisine yağ altı (parafin oil, LifeGlobal) 75 $\mu$ l'lik dropletler halinde yerleştirilmiştir. 37°C'de %5CO<sub>2</sub> 'de gazlanmaya bırakılmıştır (resim 2.6.).



**Resim 2.6.** ICSI Sonrası Oosit İnkübasyonu İçin Hazırlanmış Kültür Kabı.

### **2.1.6. ICSI Hazırlığı**

ICSI işleminde, injection pipet (Cook) ve holding pipet (Sunlight Medical) kullanılarak invert mikroskop (Nikon Eclipse TE300) altında mikromanipülatör yardımıyla (Nikon Narishige) oositlerin döllenmeleri sağlanmıştır. 18-20. saatlerde 2PN kontrolü yapılmıştır.

### **2.2. Vitrifikasyon İşlemi**

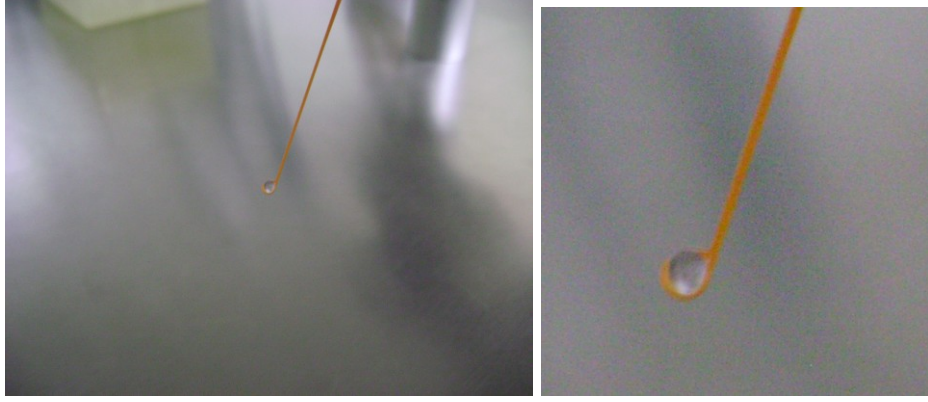
Vitrifikasyon işlemi, Cryologic vitrifikasyon seti ile yapılmıştır. Ön hazırlıktan sonra her çalışma grubu için belirlenen farklı yüzdelerdeki solüsyonlar içerisinde değişik zaman aralıkları tutulan (resim 2.7.) oosit/oositler 0,1-10 µl'lik pipet yardımıyla fibreplug adındaki vitrifikasyon için özel olarak dizayn edilmiş kancaya ~1-1,5 µl volümde yüklenmiştir (resim 2.8). Kanca ucundaki küçük volümlerdeki dropletlerin (resim 2.9.) soğuk blok yüzeye belli süre (ortalama 10 sn) dokundurulması ile oositin ve/veya oositlerin vitrifikasyonu sağlanmıştır (resim 2.10.). Daha sonra üzerinde vitrifikasyonu tamamlanmış oositleri barındıran fibreplug, spesifik kılıfı içerisine yerleştirilip (resim 2.11.) goblete transfer edilmiştir (resim 2.12.) ve kullanılacak zamana kadar sıvı azotta saklanmıştır (resim 2.13.).



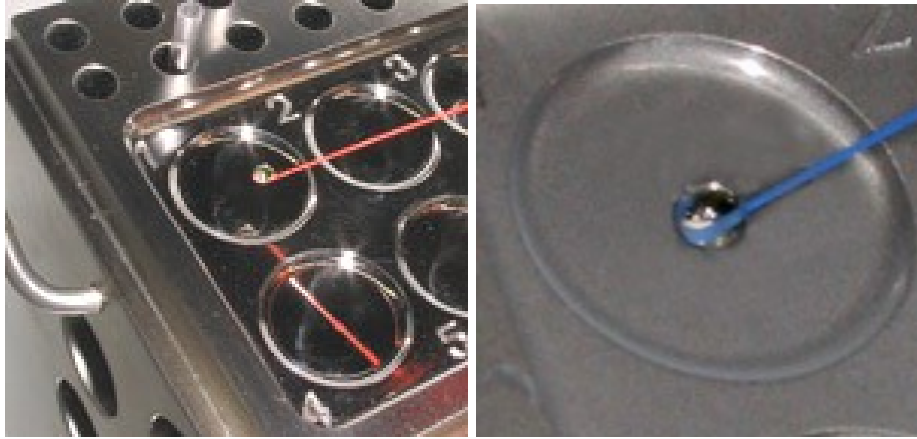
**Resim 2.7.** Vitrifikasyon Solüsyonlarına Oositlerin Transferi.



**Resim 2.8.** Vitrikiye Edilecek Oositlerin Fibreplug Ucundaki Kancaya KPA Solüsyonu ile Birlikte Yüklene Anı.



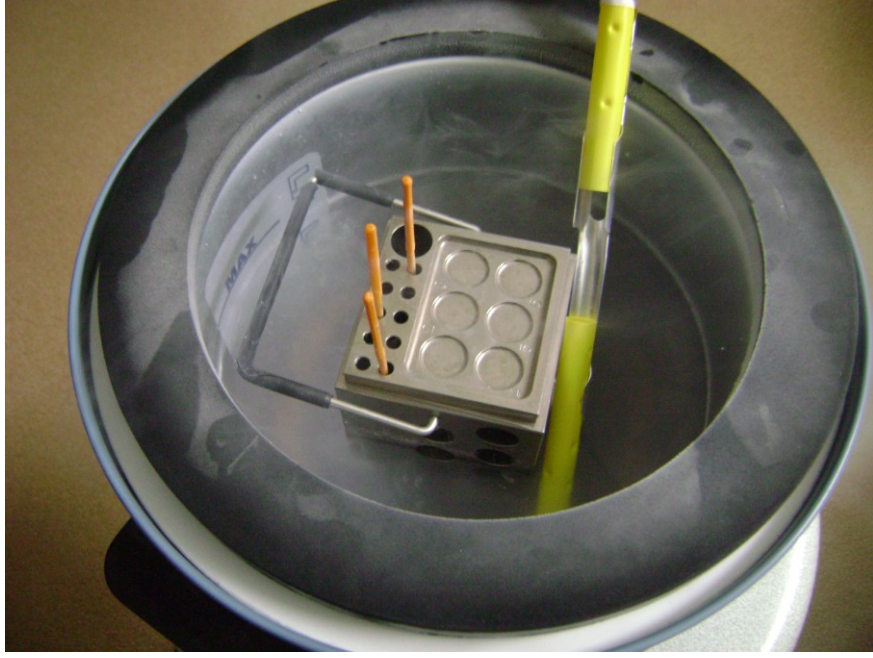
**Resim 2.9.** Fibreplug Ucunda KPA+Oosit.



**Resim 2.10.** Fibreplug Ucundaki Kancanın Soğuk Metal Yüzeye Teması.  
Vitrifikasyon Anı (Cryologic Vitrification Method 2010).



**Resim 2.11.** Vitrifiye Edilen Oositleri Barındıran Fibreplug'ın Kılıfına  
Yerleştirilmesi.



**Resim 2.12.** Saklanmak Üzere Sıvı Azota Atılmadan Önceki Son Durum.



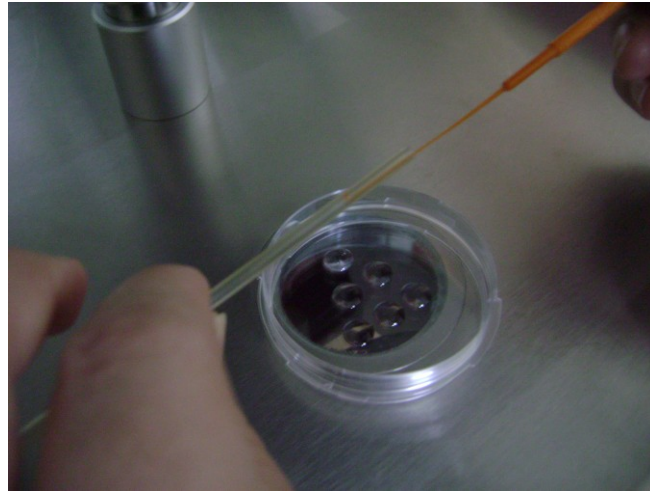
**Resim 2.13.** İçerisinde Oosit Yüklü Fibreplug'ların Bulunduğu Gobletin, Saklanacağı Sıvı Azot Tankına Bırakılması.

### 2.3. Çözme İşlemi

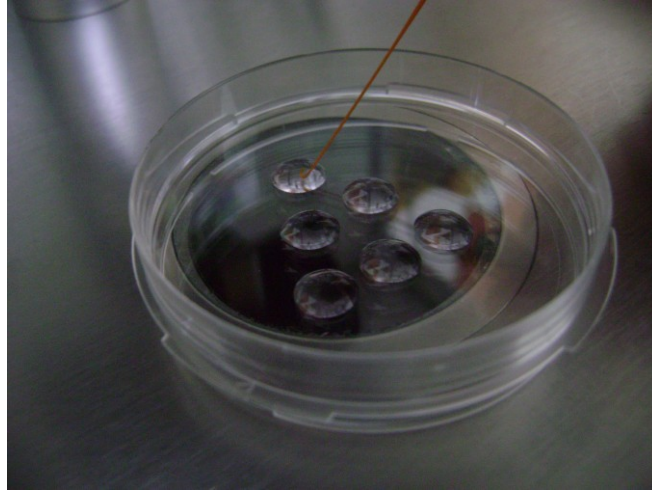
Dondurulan oositlerin çözündürülmesi işleminde ise sıvı azottan çıkarılan fibreplug (resim 2.14.) kılıfından çıkarılıp (resim 2.15.) direkt farklı sükroz molaritelerindeki çözme solüsyonu (resim 2.16.) ve ardından yıkama solüsyonu içerisine alınarak farklı zaman aralıklarında bekletilmiştir (resim 2.17.). Dondurma işlemi nedeniyle büzüşen oositlerin eski halini alması başka deyişle çözülerek canlılığına kaldığı yerden devam ettirmesi sağlanmıştır. Tüm çalışma laminar flow altında 37°C'de gerçekleştirilmiştir.



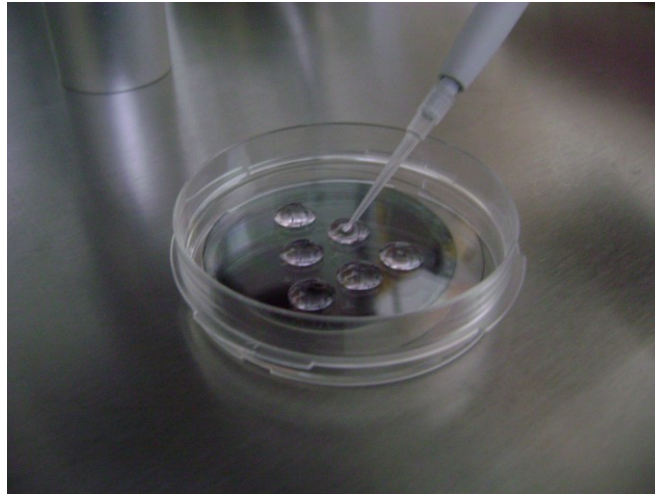
**Resim 2.14.** Çözme Öncesi Sıvı Azottan Çıkarılan Oositlerin Bulunduğu Fibreplug.



**Resim 2.15.** Çözme Öncesi Fibreplug'ın Kılıfından Çıkarılması.



**Resim 2.16.** Vitrifiye Edilmiş Oositlerin Çözülme Anı.



**Resim 2.17.** Çözünmüş Oositlerin Sükroz Solüsyonlarından Geçirilmesi.

KPA'nın Uzaklaştırılması.

#### **2.4. Morfometrik Analiz**

3 gruptaki her bir oosit için;

- 1) Vitrifikasyon öncesi ve çözme sonrasında zona pellusida kalınlığı, oosit çapı hesaplanmıştır (Dewinter Biowizard 4.3 2007). Bu sonuçlara

dayanarak oositin alan ( $4\pi r^2$ ) ve hacminden ( $4/3\pi r^3$ ) oosit yüzey alanı/hacim oranı bulunmuştur.

2) 2PN kontrolü yapıp fertilizasyon oranları belirtilmiştir.

3) Çalışmamızın istatistiksel analizinde fertilizasyon oranları ve oosit ölçümleri "SPSS for Windows 16.0" programında yapıldı. Fertilizasyon oranları için Chisquare (non-parametrik) Test, oosit ölçümleri için de Independent Sample's T-Test istatistiksel analizleri kullanıldı. Anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alındı.

## 2.5. Çalışma Grupları

Vitrifikasyon işlemi için oositler, dengeleme solüsyon yüzdesine, dengeleme solüsyonuna maruz bırakma süresine ve çözme solüsyonundaki süktroz molaritesine göre 4 gruba ayrılmışlardır.

Grup I (n=60) oositlerinin vitrifikasyonunda oositler, dengeleme solüsyon oranı sırasıyla %3,75 - %5 - %7,5 (DMSO/EG, 1:1) olan solüsyonları içeren dropletlerin herbirinde 0,5-1dk olmak üzere toplam 3,5dk boyunca bırakılarak sonrasında %15'lik vitrifikasyon solüsyonuna transfer edilmiştir. 30-40sn vitrifikasyon solüsyonunda tutulan oosit/oositler ~1-3µl volümlerde fibreplug ucundaki kancaya aktarılmıştır. İçerisinde oositleri bulunduran droplet soğutulmuş metal blok yüzeye 10-15sn değdirilmek suretiyle vitrifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Kılıfına yerleştirilerek vitrifikasyonları tamamlanan oositler alüminyum taşıyıcıların yardımıyla LN<sub>2</sub> içerisinde saklanmıştır.

Çözme işlemi için LN<sub>2</sub>'den çıkarılan goblet içerisindeki fibreplug 37°C'ye getirilmiş 0,5M - 0,2 M süktroz içeren çözme solüsyonlarından sırasıyla molaritesi çoktan aza doğru 5dk içerisinde geçirilmiştir (herbirinde ~1,5-2dk). Arkasından 5dk boyunca yıkama solüsyonuna alınan oositler, vitrifikasyon öncesi durumlarını tekrar geri kazanabilmeleri için kültür medyumuna alınarak 3 saat inkübasyona tabi tutulmuştur.

İnkübasyon sonrası oositlere ICSI işlemi uygulanmıştır. 18-20. saatlerde 2PN kontrolü yapılan oositlerin fertilizasyon oranları değerlendirilmiştir.

Grup II (n=20) oositlerinin vitrifikasyonunda oositler, dengeleme solüsyon oranı sırasıyla %1,37 - %3,75 - %7,5 (DMSO/EG, 1:1) olan solüsyonları içeren dropletlerin herbirinde 2,5-3dk olmak üzere toplam 7-9dk boyunca bırakılarak sonrasında %15'lik vitrifikasyon solüsyonuna transfer edilmiştir. 30-40sn vitrifikasyon solüsyonunda tutulan oosit/oositler ~1-3µl volümlerde fibreplug ucundaki kancaya aktarılmıştır. İçerisinde oositleri bulunduran droplet soğutulmuş metal blok yüzeye 10-15sn değdirilmek suretiyle vitrifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Kılıfına yerleştirilerek vitrifikasyonları tamamlanan oositler alüminyum taşıyıcıların yardımıyla LN<sub>2</sub> içerisinde saklanmıştır.

Çözme işlemi için LN<sub>2</sub>'den çıkarılan goblet içerisindeki fibreplug 37°C'ye getirilmiş 0,5M - 0,2 M süktroz içeren çözme solüsyonlarından sırasıyla molaritesi çoktan aza doğru 5dk içerisinde geçirilmiştir (herbirinde ~1,5-2dk). Arkasından 5dk boyunca yıkama solüsyonuna alınan oositler, vitrifikasyon öncesi durumlarını tekrar geri kazanabilmeleri için kültür medyumuna alınarak 3 saat inkübasyona tabi tutulmuştur.

İnkübasyon sonrası oositlere ICSI işlemi uygulanmıştır. 18-20. saatlerde 2PN kontrolü yapılan oositlerin fertilizasyon oranları değerlendirilmiştir.

Grup III (n=16) oositlerinin vitrifikasyonunda oositler, dengeleme solüsyon oranı sırasıyla %3,75 - %5 - %7,5 (DMSO/EG, 1:1) olan solüsyonları içeren dropletlerin herbirinde 2,5-3dk olmak üzere toplam 7-9dk boyunca bırakılarak sonrasında %15'lik vitrifikasyon solüsyonuna transfer edilmiştir. 30-40sn vitrifikasyon solüsyonunda tutulan oosit/oositler ~1-3µl volümlerde fibreplug ucundaki kancaya aktarılmıştır. İçerisinde oositleri bulunduran droplet soğutulmuş metal blok yüzeye 10-15sn değdirilmek suretiyle vitrifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Kılıfına yerleştirilerek vitrifikasyonları tamamlanan oositler alüminyum taşıyıcıların yardımıyla LN<sub>2</sub> içerisinde saklanmıştır.

Çözme işlemi için LN<sub>2</sub>'den çıkarılan goblet içerisindeki fibreplug 37°C'ye getirilmiş 1,25M - 0,6 M - 0,3 M süktroz içeren çözme solüsyonlarından sırasıyla molaritesi çoktan aza doğru 5 dk içerisinde geçirilmiştir (herbirinde ~1,5-2dk ). Arkasından 5 dk boyunca yıkama solüsyonuna alınan oositler, vitrifikasyon öncesi durumlarını tekrar geri kazanabilmeleri için kültür medyumuna alınarak 3 saat inkübasyona tabi tutulmuştur.

İnkübasyon sonrası oositlere ICSI işlemi uygulanmıştır. 18-20. saatlerde 2PN kontrolü yapılan oositlerin fertilizasyon oranları değerlendirilmiştir.

Grup IV (n=16) oositlerinin vitrifikasyonunda oositler, dengeleme solüsyon oranı sırasıyla %1,37 - %3,5 - %5 - %10 (DMSO/EG, 1:1) olan solüsyonları içeren dropletlerin herbirinde sırasıyla 30sn-30sn -60sn-90sn olmak üzere toplam 3,5dk boyunca bırakılarak sonrasında %15'lik vitrifikasyon solüsyonuna transfer edilmiştir. 30-40sn vitrifikasyon solüsyonunda tutulan oosit/oositler ~1-3µl volümlerde fibreplug ucundaki kancaya aktarılmıştır. İçerisinde oositleri bulunduran droplet soğutulmuş metal blok yüzeye 10-15sn değdirilmek suretiyle vitrifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Kılıfına yerleştirilerek vitrifikasyonları tamamlanan oositler alüminyum taşıyıcıların yardımıyla LN<sub>2</sub> içerisinde saklanmıştır.

Çözme işlemi için LN<sub>2</sub>'den çıkarılan goblet içerisindeki fibreplug 37°C'ye getirilmiş 1,5M- 0,4M - 0,2M süktroz içeren çözme solüsyonlarından sırasıyla molaritesi çoktan aza doğru 50sn – 180sn - 120sn içerisinde geçirilmiştir. Arkasından yıkama solüsyonuna alınan oositler, vitrifikasyon öncesi durumlarını tekrar geri kazanabilmeleri için kültür medyumuna alınarak 3 saat inkübasyona tabi tutulmuştur.

İnkübasyon sonrası oositlere ICSI işlemi uygulanmıştır. 18-20. saatlerde 2PN kontrolü yapılan oositlerin fertilizasyon oranları değerlendirilmiştir.

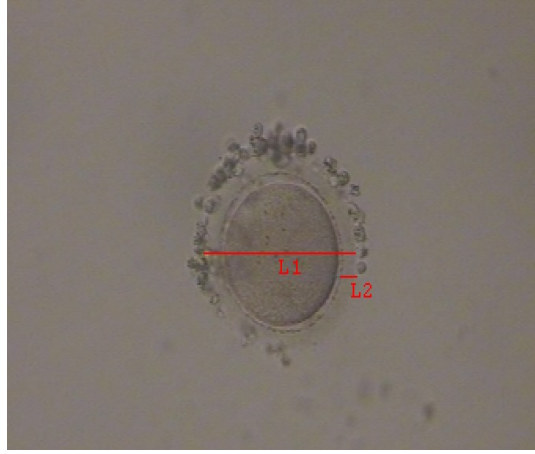
Grup V Kontrol (n=240) oositlerinde ise rutin tüp bebek işlemi sırasında hastaların toplanan matür oositleri için hiyalüronidaz, ICSI ve kültür inkübasyonu işlemleri gerçekleştirildi ve oositlerin sadece 18-20. saat fertilizasyon bakımından 2PN gözlemleri yapıldı.

### 3. BULGULAR

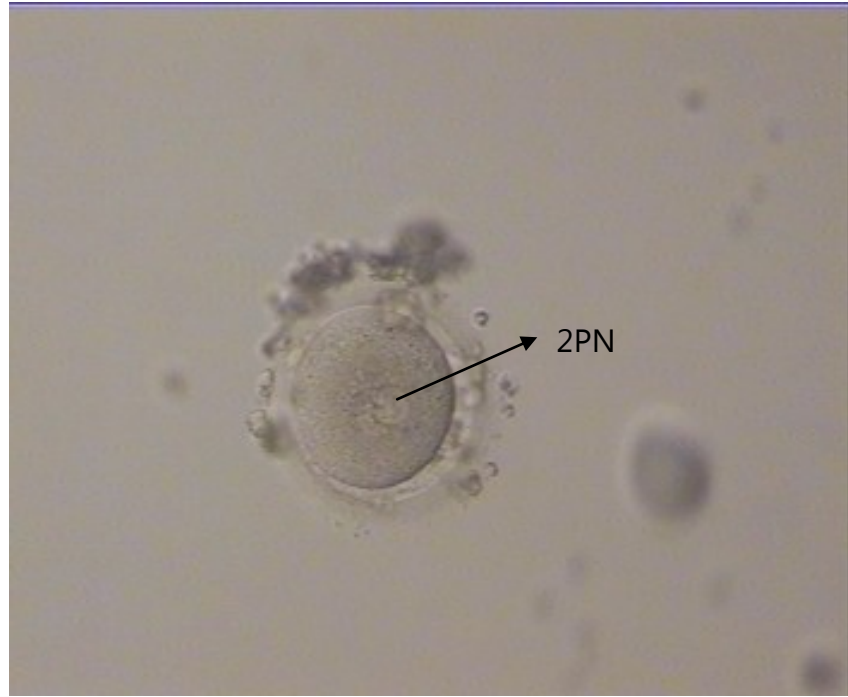
Fakülte etik kurul onayı alınarak yapılan bu çalışma Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne infertilite sebebiyle başvuran hastaların ICSI işlemi sonrasında arta kalan oositleri ile gerçekleştirilmiştir.

Hastaya ait arta kalan işlem dışı yumurta hücreleri imha edilmeden vitrifikasyon modellemeleri için kullanılmıştır. Bilgi onay formuyla izinleri alınmış vakalara ait arta kalan toplam 112 oosit üzerinde çalışılmıştır. Tüp bebek işlemi sırasındaki hastalara ait 240 oosit rutin tüpbebek işlemine alınmış olup fertilizasyon oranları gözlemlenmiştir ve çalışmada kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

MII gelişim basamağında olan matür oositlerle gerçekleştirdiğimiz çalışmada değişen konsantrasyonlarda KPA içeren solüsyonlara, farklı sükröz molaritelerindeki çözme solüsyonlarına ve bu solüsyonlara maruz bırakma sürelerine göre oositlerin morfometrik değişiklikleri ve ICSI işlemi (resim 3.14) sonrasında 18-20. saatlerde fertilizasyon oranları değerlendirilmiştir (çizelge 3.1.). Vitrifikasyon işlemi öncesi ve çözme işlemi sonrasında morfometrik değişiklikler Dewinter Micromasurement & Image Analysis Software Biowizard ile ölçülmüş olup (resim 3.1.), fertilizasyon oranları ICSI sonrası 18-20. saatlerde 2PN kontrolü ile belirlenmiştir. Ortaya çıkan sonuçlar gruplar arasında karşılaştırılmıştır.



**Resim 3.1.** Dewinter Biowizard 4.3 Ölçüm Programı ile Farklı Oosit Parametrelerinin Ölçümü; L1: Oosit Çapı, L2: Zona Pellusida Kalınlığı.



**Resim 3.2.** ICSI Sonrası 18-20. Saatlerde 2PN Görüntüsü.

**Tablo 3.1.** Gruplarda Kullanılan KPA Konsantrasyonu, Süresi ve Çözme Solüsyonu Sükroz Oranı.

|        | KPA konsantrasyonu<br>(%) | KPA süresi<br>(dk) | Sükroz<br>(M) |
|--------|---------------------------|--------------------|---------------|
| Grup I | 3,75 - 5 - 7,5            | 3,5                | 0,5 - 0,2     |

|          |                    |     |                  |
|----------|--------------------|-----|------------------|
| Grup II  | 1,37 - 3,75 - 7,5  | 7-9 | 0,5 - 0,2        |
| Grup III | 3,75 - 5 - 7,5     | 7-9 | 1,25 - 0,6 - 0,3 |
| Grup IV  | 1,37- 3,5 - 5 - 10 | 3,5 | 1,5 - 0,4 - 0,2  |

Grup I'de oositler yüksek konsantrasyonlu KPA solüsyonlarına kısa süre maruz bırakılmakla birlikte Grup II oositlerinde bu konsantrasyon düşürülerek maruz bırakma süresi uzatılmıştır. 2 grupta da standart bir çözme uygulanmıştır. Karşılaştırma yapıldığında Grup I'de Grup II'ye (%28) göre %70'lik bir fertilizasyon gözlenmiştir. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla birlikte KPA solüsyonuna maruz bırakma süresi ile oosit kalitesi arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir ( $P<0,05$ ).

Vitrifikasyon solüsyonlarının konsantrasyon yüzdelerinin öneminin bilinmesi üzerine maruz bırakma süreleri Grup II ve Grup III için eşit tutularak (her bir droplet için 2,5 - 3dk olmak üzere toplam 7 - 9dk) Grup III'deki oositler %3,75 - %5 - %7,5 konsantrasyonlarındaki dengeleme solüsyonlarına maruz bırakılıp Grup II'deki oositler daha düşük konsantrasyon yüzdelerinden başlayan %1,37 - %3,75 - %7,5'luk solüsyonlara maruz bırakılarak toksik ve ozmotik etki azaltılmaya çalışılmıştır ve çözme solüsyonlarındaki sükröz oranları Grup III'de 1,25M - 0,6M - 0,3M olmakla birlikte Grup II'de 0,5M - 0,2M'lık bir oran kullanılmıştır. Gruplar karşılaştırıldığında Grup III'te vitrifikasyon öncesi ve sonrası morfometrik farklılıklar gözlenmiştir. Bu, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,024$ ).

Fertilizasyon oranları gözlemlendiğinde Grup II'de %40'lık bir başarı elde edilmiştir. Grup III de ise fertilizasyon oranı %28 bulunmuştur. Bu konsantrasyonlardaki KPA solüsyonlarına maruz bırakma sonucunda fertilizasyon oranlarının diğerlerine göre düşük olduğunu aynı zamanda

yüksek molaritelerdeki süktroz kullanımının hızlı bir rehidrasyona sebep olup hücrenin bunu tolere edemediğini göstermiştir. %40'lık bir fertilizasyonun daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P>0,05$ ).

KPA solüsyonlarına hücreleri maruz bırakma süresinin uzamasının hücre üzerindeki etkilerini incelemek için KPA konsantrasyonlarını sabit tutarak Grup I ve Grup III karşılaştırıldığında Grup I'de oositler KPA'ya 3,5 dk maruz bırakılmakla birlikte Grup III'te ki oositler 7-9 dk gibi uzun bir süre bırakılmışlardır. Grup III oositleri çözme sonrası, vitrifikasyon öncesi durumları ile kıyaslandığında morfometrik olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir ( $p=0,024$ ).

Fertilizasyon oranları ise Grup I'e oranla (%70) Grup III'te büyük oranda düşük çıkmıştır (%28). İstatistiksel olarak ta anlamlı olan bu sonuçlar KPA konsantrasyonları kadar KPA'ya maruz bırakma süresinin de önemli olduğunu göstermiştir ( $P<0,05$ ).

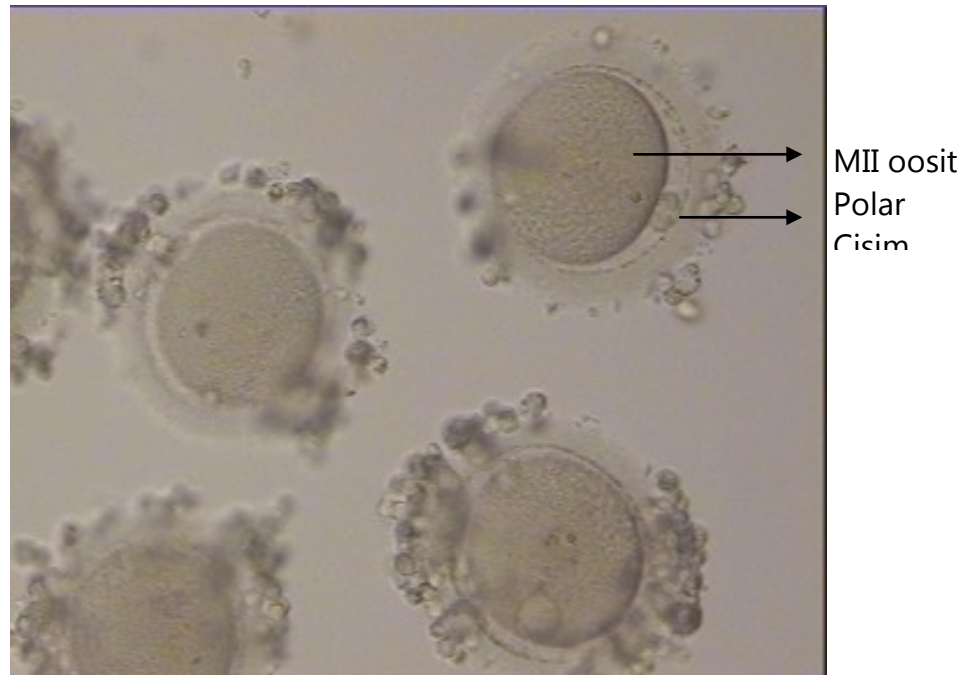
Grup IV oositleri Grup I, II ve III ile karşılaştırıldığında fertilizasyon oranları bakımından anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ( $P>0,05$ ).

Kontrol grubu olan rutin tüp bebek hastalarımızın oositlerinde ise fertilizasyon oranı %82 olarak bulunmuştur (resim 3.15.).

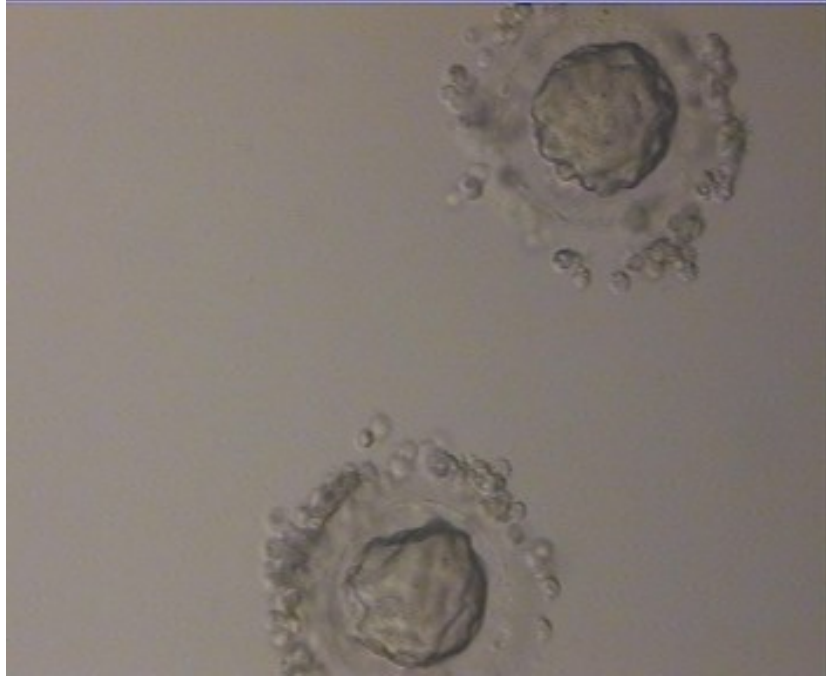
Ayrıca grupların vitrifikasyon işlemi boyunca, dengeleme ve vitrifikasyon solüsyonlarındaki dehidrasyonları (resim 3.16) ile çözme işlemi boyunca süktroz solüsyonlarındaki rehidrasyonları (resim 3.17) gözlenmiştir.

**Tablo 3.2.** Gruplardaki VÖ (Vitrifikasyon Öncesi) ve ÇS (Çözme Sonrası) Morfolojik Ölçüm Sonuçları.

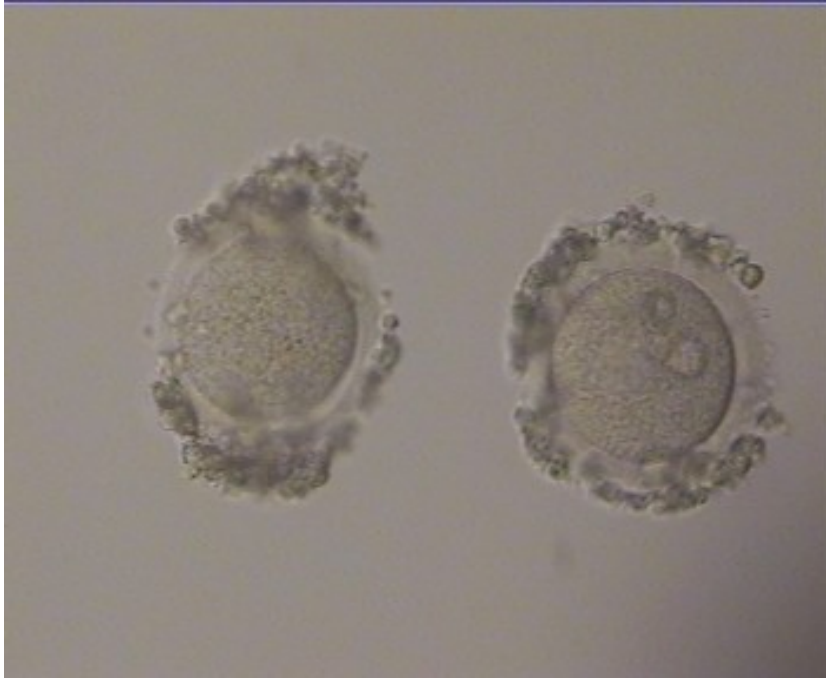
|              | Hacim/Yüzey Alanı<br>( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) |      | Oosit Çapı<br>( $\mu\text{m}$ ) |        | Zona Pellusida Kalınlığı<br>( $\mu\text{m}$ ) |       | Fertilizasyon Oranları<br>(%) |
|--------------|--------------------------------------------------------|------|---------------------------------|--------|-----------------------------------------------|-------|-------------------------------|
|              | VÖ                                                     | ÇS   | VÖ                              | ÇS     | VÖ                                            | ÇS    |                               |
| GrupI        | 23,6                                                   | 22,9 | 158,69                          | 153,60 | 24,48                                         | 23,93 | 70                            |
| GrupII       | 23,3                                                   | 23,3 | 156,92                          | 154,72 | 27,02                                         | 23,92 | 40                            |
| GrupIII      | 21,9                                                   | 19,9 | 150,81                          | 141,35 | 28,96                                         | 24,93 | 28                            |
| GrupIV       | 22,1                                                   | 23,3 | 151,12                          | 149,23 | 26,54                                         | 26,46 | 50                            |
| Grup Kontrol | -                                                      | -    | -                               | -      | -                                             | -     | 82                            |



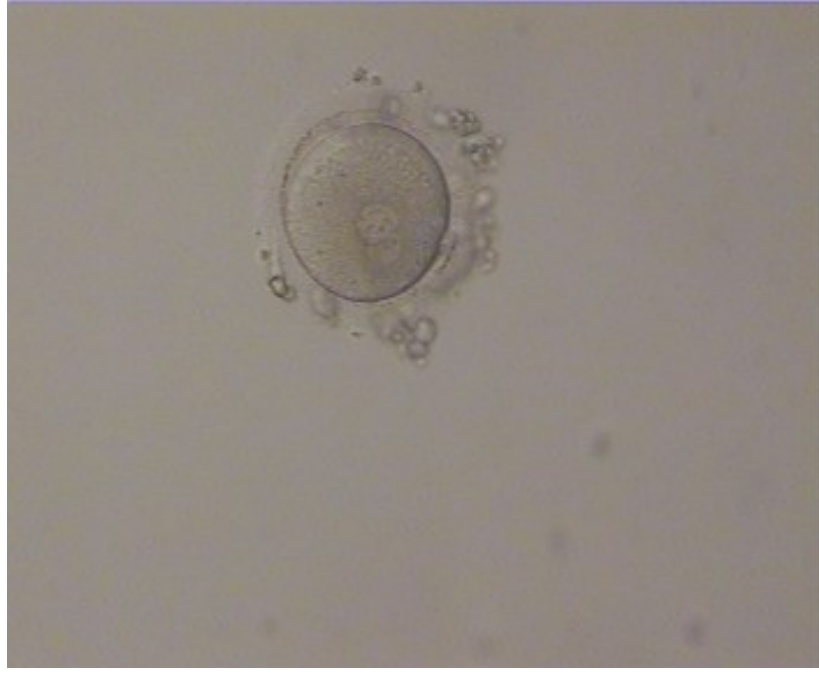
**Resim 3.3.** Grup I Vitrifikasyon Öncesi Taze Oositler.



**Resim 3.4.** Grup I Dengeleme Solüsyonunda Oositlerin 2. dk'sı ve Dehidrasyon.



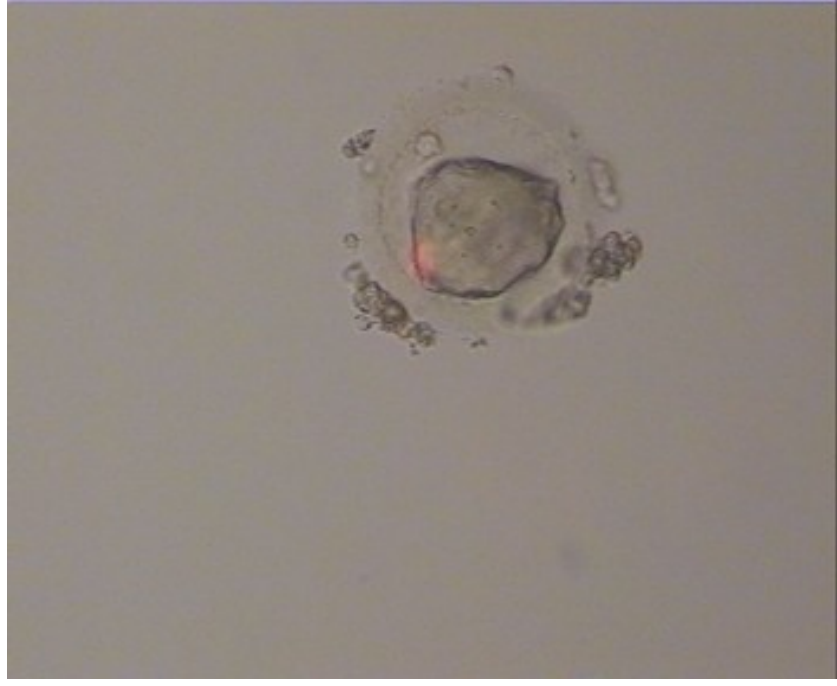
**Resim 3.5.** Grup I Çözme Sonrası 2 Saatlik İnkübasyondan Sonra Kültür Medyumunda Oositler.



**Resim 3.6.** Grup I Donmuş-Çözünmüş ve Döllenmiş Oositte ICSI Sonrası 18-20. Saat 2PN.



**Resim 3.7.** Grup II Vitrifikasyon Öncesi Taze Oositler.



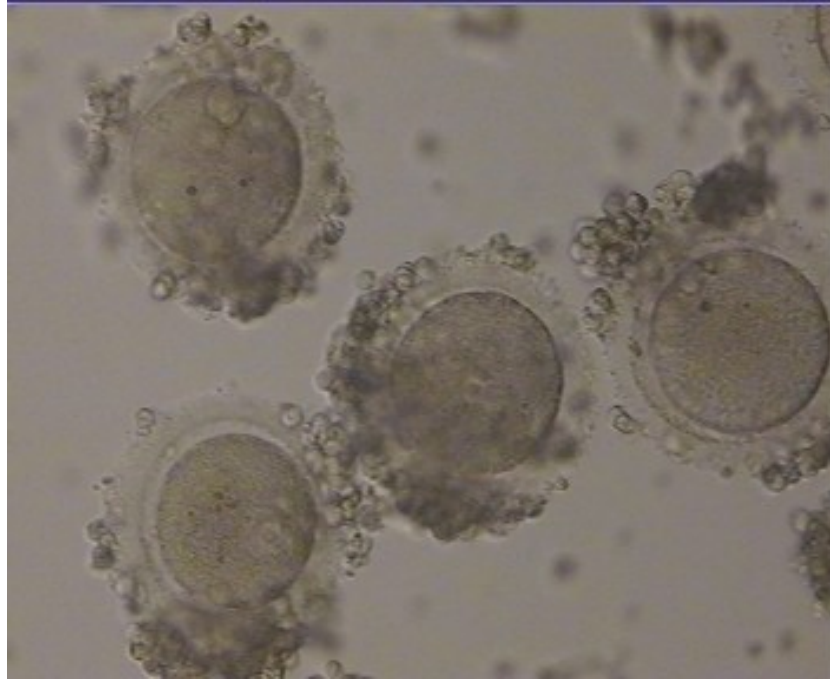
**Resim 3.8.** Grup II Dengeleme Solüsyonunda Oositlerin 3. dk'sı ve Dehidrasyon.



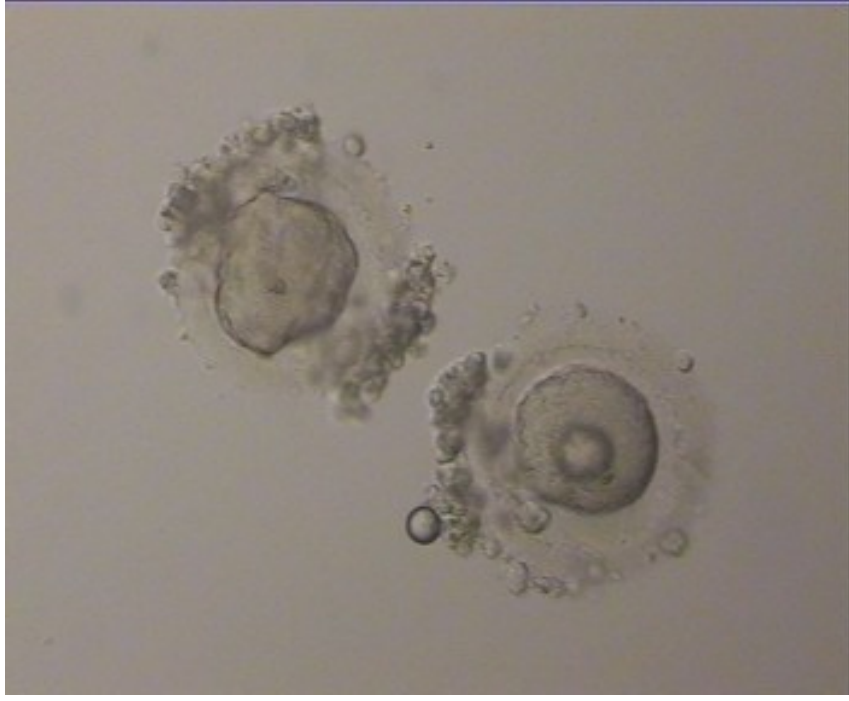
**Resim 3.9.** Grup II Çözme Sonrası 2 Saatlik İnkübasyondan Sonra Kültür Medyumunda Oositler.



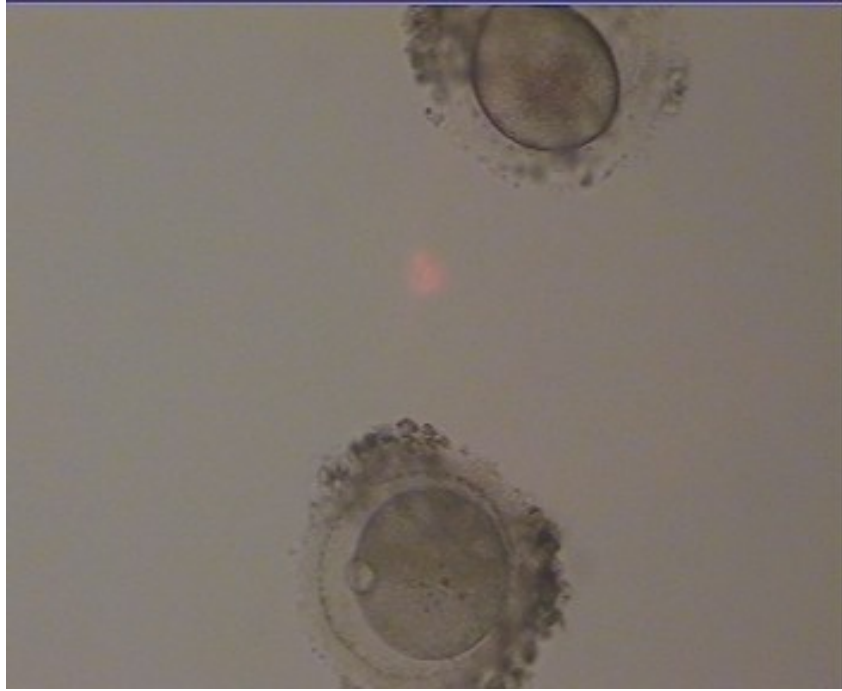
**Resim 3.10.** Grup II Donmuş-Çözünmüş Dölllenmiş Oositte ICSI Sonrası 18-20. Saat 2PN.



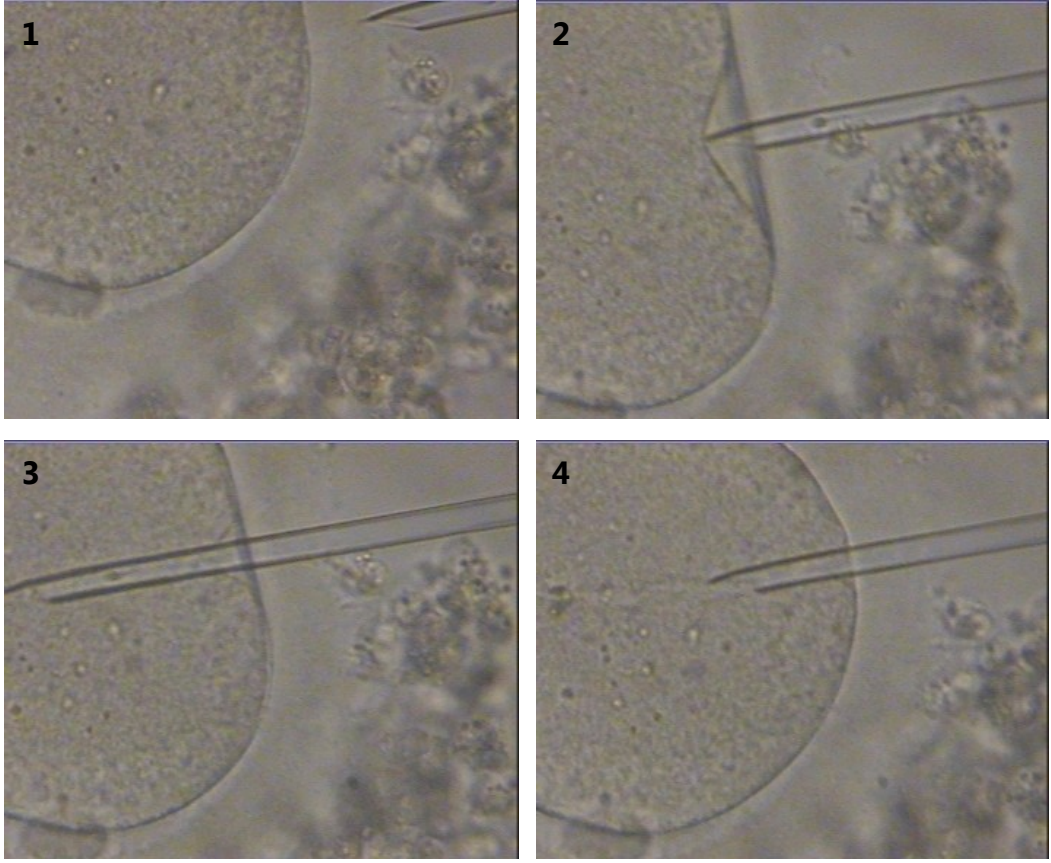
**Resim 3.11.** Grup III Vitrifikasyon Öncesi Taze Oositler.



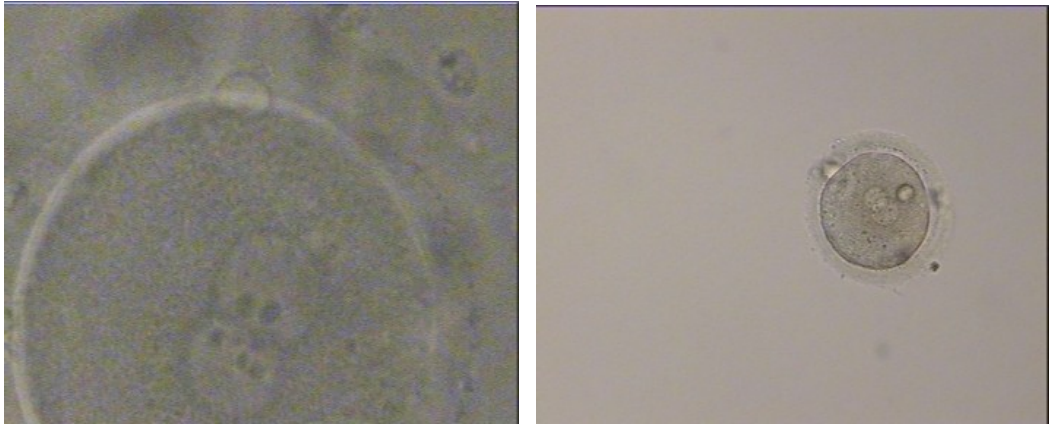
**Resim 3.12.** Grup III Dengeleme Solüsyonunda Oositlerin 3. dk'sı ve Dehidrasyon.



**Resim 3.13.** Grup III Çözme Sonrası Kültür Medyumunda Oositler.

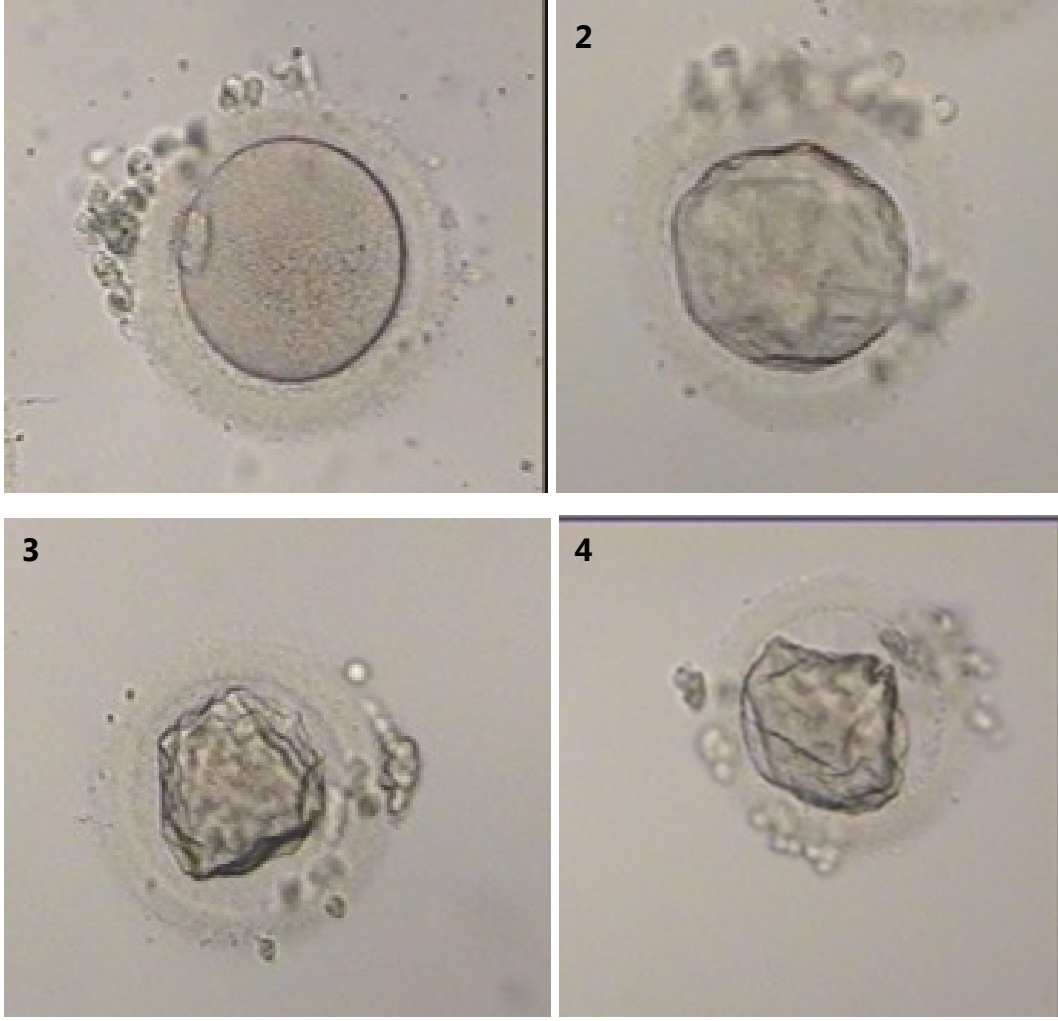


**Resim 3.14.** Çözme Sonrası Oositlerin ICSI İşlemi.

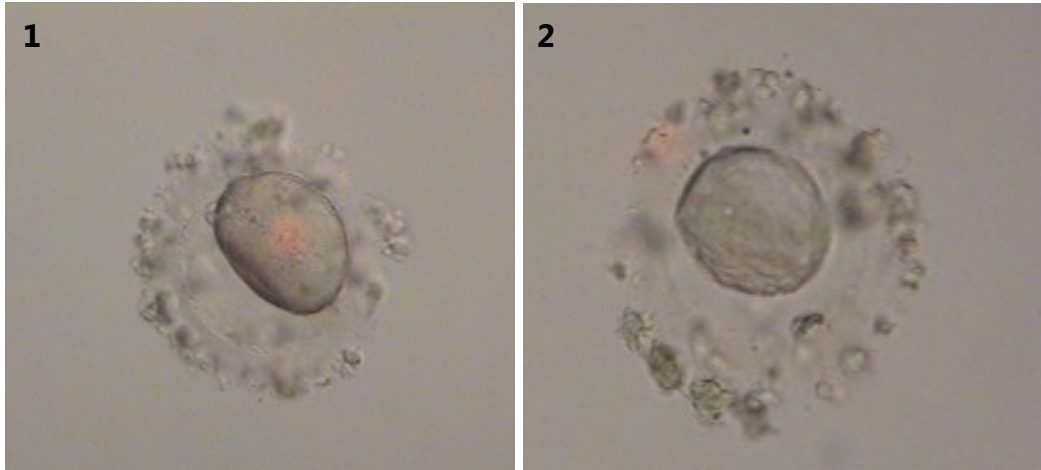


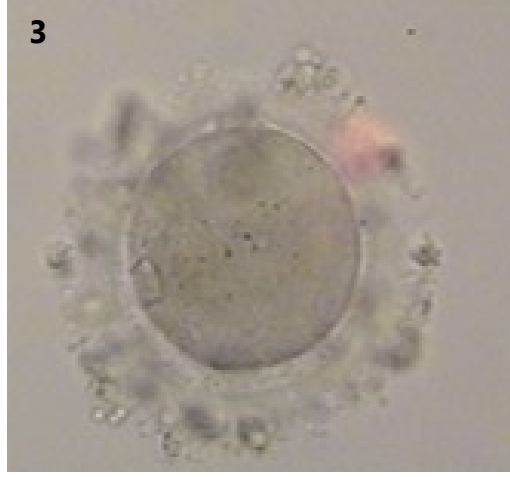
**Resim 3.15.** Kontrol Grubu Oositlerin 18-20. saat 2PN Görüntüsü.

1



**Resim 3.16.** Vitrifikasyon İşlemi Sırasında Gerçekleşen Dehidrasyon.





**Resim 3.17.** Çözme İşlemi Sırasında Gerçekleşen Rehidrasyon.

#### **4. TARTIŞMA**

Biyolojik hücre ve dokuların yapı ve fonksiyonunu dondurarak korumak, temel biyoloji ve klinik sahada önemli bir rol oynamaktadır (Gook ve Edgar 2007). Fertilitenin korunması da son yıllarda klinik zorunluluklar ve teknolojiye ilerlemelerin bir sonucu olarak hızlı bir şekilde gelişme göstermiştir (Gosden ve Nanago 2002). Bu nedenle insan oositlerinin kriyoprezervasyonu (dondurularak saklanması) YÜT'te önemli bir yere sahiptir. Oosit kriyoprezervasyonu klinik yaklaşımlara embriyo kriyoprezervasyonundan daha yakındır (Chen ve ark 2003). Örneğin; cerrahi, kemoterapi ya da radyoterapi gibi sebeplerden dolayı ovarial fonksiyonun

kaybolması gibi durumlarda gelecekte kullanılmak üzere oositler saklanabilir (Gidoni ve ark 2008, Porcu ve ark 2008). Bu durum embriyo kriyoprezervasyonuna bir alternatiftir (Parmegiani ve ark 2008).

American Society for Reproductive Medicine (ASRM)'a göre Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS) tüpbebek hazırlığı aşamasında meydana gelen şiddetli komplikasyonlardan biridir ve hCG'ye her maruz kalmada bu sendromun riski artar (Klemetti ve ark 2005). Sekonder OHSS ile ilişkili komplikasyonları önlemek için kriyoprezervasyon iyi bir stratejidir. OHSS hastasına Embriyo Transferi (ET) öncesi toparlanma süresi gerekir. Hasta sağlığına kavuştuğu zaman donmuş olan embriyolar ve/veya oositler (yasal düzenlemeler şu anda izin vermiyor) çözülüp döllendikten sonra hastaya transfer edilir (Delvigne ve Rozenberg 2002).

Gamet kriyoprezervasyonu, YÜT ve biyoteknoloji alanlarında ilerlemelerin sağlanmasında önemli bir araçtır (Leibo 1992). Fakat oositler soğuk hasarına aşırı şekilde eğilimlidir. Bu durum başarılı bir kriyoprezervasyonu sınırlandıran ana faktördür (Yavin ve Arav 2007).

Memeli dışı gametleri vücut sıcaklığının dışındaki sıcaklıklarda kolaylıkla hasarlanabilir (Ghetler ve ark 2005). Çünkü tehlikeli olarak bilinen 0-8°C arası sıcaklıklar fizyolojik vücut sıcaklığının altındadır ve soğuk hasarına sebep olur. Örneğin; membranlar soğuma sırasında membran yapı ve fonksiyonunu değiştiren membran lipid faz değişikliğinden dolayı hasarlanır (Yavin ve Arav 2007).

Dondurulup çözülmüş insan oositlerinden gelişen ilk gebelik 1986'da gerçekleşmiştir (Chen 1986). 1987'lerde dondurulmuş oositler ile ilgili

gelişmeler yavaştır ve çok az sayıda doğum bildirilmiştir (Al-Hasani ve ark 1987, Van Uem ve ark 1987). Bunun sebebi taze oositlerle karşılaştırıldığında kriyoprezerve oositlerin daha yüksek oranda kromozomal anomali gösterme riski (Pickering ve Johnson 1987) ve zona sertleşmesinden kaynaklanan düşük fertilizasyon oranlarıdır (Vincent ve ark 1990b, George ve ark 1993). 1990'larda oosit kriyoprezervasyonunun ardından gerçekleşen ICSI uygulamaları ile önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bunu takiben yapılan araştırmalar oosit kriyoprezervasyonunun zararlı olmadığı düşüncesini kanıtlamıştır (Gook ve ark 1994).

Birçok türde başarılı oosit kriyoprezervasyonu yapılmasına rağmen klinik sonuçlar tatmin edici nitelikte değildir. Çünkü kriyoprezervasyon sonrası oositlerin canlılık oranları ve morfolojileri biyofiziksel faktörler tarafından etkilenir (Ledda ve ark 2007). Kriyoprezervasyon sırasında hücresel hasarlara sebep olan bu biyofiziksel faktörlerin en önemlileri intrasellüler buz oluşumu (Mazur ve ark 2005) ve ozmotik hasardır (Liebermann ve Tucker 2002). Bu faktörler uygun bir KPA, KPA konsantrasyonu seçimi (Wani ve ark 2004), KPA'ya maruz bırakma ve uzaklaştırma süresi (Nowshari ve ark 1994), elverişli soğutma ve çözme oranları ve uygun taşıyıcılar ile gerçekleşen kriyoprezervasyon teknikleri ile minimize edilebilir (Ren ve ark 1994).

Kriyoprezervasyon çeşitleri yavaş soğutma, hızlı soğutma ve vitrifikasyon olmak üzere 3 başlık altında toplanabilir. Vitrifikasyon son zamanlarda geliştirilmiş buz kristali oluşturmadan camsı bir fazın şekillenmesi ile gerçekleşen dondurma yöntemidir (Yavin ve Arav 2007). Camsı faza geçiş termodinamik bir olaydan ziyade kinetik bir durumdur. Bu işlem sırasında kristalizasyon oluşturabilecek konsantrasyon gradientlerinin kullanılmasından kaçınılır ve bu sebeple kristalizasyon ile ilişkili toksik ve ozmotik hasar

engellenmiş olunur. Herhangi bir sıvı materyalin kristal oluşumunu önlemek için yeterli hızda soğutulduğu sürece vitrifiye edilebildiği rutin olarak kanıtlanmıştır. Hücre ya da dokular, cam geçiş sıcaklığı adı verilen bir sıcaklığın altına soğutulup stabil bir hale ulaştığı zaman kristalizasyon meydana gelmeyebilir. Ciotti ve ark (2009) yaptıkları bir çalışmada yavaş soğutma grupları ile karşılaştırıldığında vitrifikasyon gruplarında daha hızlı bir mayotik iş yenilenmesi olduğu sonucuna varmışlardır.

Başarılı bir vitrifikasyon 3 ana faktöre bağlıdır.

- a) KPA'ların yoğunluğu,
- b) Donma-çözünme hızları,
- c) İşlemden kullanılan KPA volümleri (Yavin ve Arav 2007).

Vitrifikasyon solüsyonlarının toksik etkisini azaltmak için diğer önemli strateji KPA'ların adım adım eklenmesidir. Başlıca 2 basamaklı bir proses kullanılır (Chen ve Yang 2007). İlk basamakta kullanılan ön işlem solüsyonu olan dengeleme solüsyonu, konsantrasyon bakımından vitrifikasyon solüsyonundan daha düşüktür. Bu yüzden de daha az toksiktir. Oositler dengeleme solüsyonunda hacim olarak su kaybettiklerinden ilk olarak büzülmeye başlarlar. Sonra yavaşça tekrar genişleyip volümlerini arttırırlar. Bu oositin içine permeabl KPA'ların girişini gösterir. Bu işlem, sonrasında oositler için daha toksik olan vitrifikasyon solüsyonuna maruz bırakmak için gerekli olan zamanı azaltır. Yaptığımız çalışmada vitrifikasyon işlemi sırasında ilerleyen basamaklarda oositlerin önce dehidre olup su kaybettiğini ve sonrasında hacimce genişleyip KPA'ların hücreye girdiğini gözlemlemiş olduk.

Dengeleme solüsyonlarına maruz bırakılan insan oositlerinin doğrudan yüksek konsantrasyonlu vitrifikasyon solüsyonlarına maruz bırakılan oositlere

göre daha yüksek canlılık oranları verdiği kanıtlanmıştır. Dengeleme solüsyonları olmadan gerçekleşen tek basamaklı vitrifikasyon, KPA'ların yetersiz permeasyonuna sebep olduğu için bu da soğuma ya da çözme sırasında intrasellüler buz kristali oluşumuna sebep olur (Chen ve ark 2000a).

Biz de yapmış olduğumuz bu optimizasyon çalışmasında oositleri önce %3,75-%5-%7,5 olan düşük konsantrasyonlu dengeleme solüsyonlarından geçirerek sonrasında daha yüksek konsantrasyondaki vitrifikasyon solüsyonunda bekletip oositlerin dehidrasyon hızını yavaşlatarak KPA'nın ozmotik şokunu önlemeye çalıştık. Aksine grup dışı ilk deneyimlerimizde kullandığımız kademeli olmayan yöntemlerde oositleri %15'lik vitrifikasyon solüsyonuna bıraktığımızda ozmotik şoku tolere edemeyip canlılıklarını yitirdiklerini gördük.

Çalışmalar embriyo kalitesini geliştiren ve implantasyon oranlarını arttıran modifikasyonları keşfetmeyi gerektirir. Paynter ve ark (2005)'na göre in vitro ortam ve dondurma-çözme solüsyonlarının sıcaklıkları ile birlikte oositlerin solüsyonlardaki bekleme süresi de çok önemlidir. Al-Hasani ve Diedrich (1995) dengeleme solüsyonlarına 10dk maruz bırakmanın, insan oositlerinin canlılık oranlarını arttırmak için yeterli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bazı araştırmacılar oda sıcaklığında oositleri KPA'lara maruz bırakmışlardır (Chen ve ark 2000a, Chian ve ark 2005, Kuwayama ve ark 2005a). Fakat araştırmacıların bazıları da 35-37°C'de (Vajta ve ark 1998, Yoon ve ark 2003) araştırmalarını gerçekleştirmişlerdir. Bir kısım araştırmacı ise çözmeyi oda sıcaklığında ve dilüsyonu 37°C'de gerçekleştirmiştir (Lucena ve ark 2006, Cobo ve ark 2008). 37°C'de dilüsyon, prosedür sırasında iğlere daha az hasar verir (Ciotti ve ark 2009).

Daha yüksek sıcaklıklar hücre membranından permeabl KPA'ların geçişini arttırır. Fakat aynı zamanda toksisite de artar. Bu nedenle 37°C'de 2-3dk dengeleme solüsyonlarına maruz bırakılırlar ve vitrifikasyon solüsyonlarında da 20-30sn bekletilirler (Vajta ve ark 1998, Yoon ve ark 2003). Aksine oda sıcaklığında dengeleme solüsyonu için 5-15dk vitrifikasyon solüsyonu için 30-60sn'nin yeterli olduğu düşünülür. (Chen ve ark 2000a, Chian ve ark 2005, Kuwayama ve ark 2005a). Biz ise çalışmamızda insan oositlerinin dengeleme solüsyonlarına 3,5dk maruz bırakılmasının yeterli olacağı fikrine sahibiz. 4 gurubumuzun dengeleme solüsyonunda geçen sürelerini incelediğimizde döllenme oranı en yüksek grubun toplam süresi 3,5dk olan grup olması sebebiyle sürenin az ve/veya çok olmasının KPA'nın hücreye permeasyonunu azaltacağı, toksisiteyi arttıracığı görüşündeyiz.

Konsantre KPA'lara uzun süre maruz bırakmak toksik bir etki oluşturur. 120sn vitrifikasyon solüsyonlarında bekletilen insan oositleri 60sn vitrifikasyon solüsyonunda bekletilenden daha düşük fertilizasyon ile sonlanır (Chen ve ark 2000a). Wood ve ark (1993) yaptıkları bir çalışmada yüksek konsantrasyonlu KPA'lara uzun süre maruz bırakmanın fare oositlerinde canlılık oranlarını önemli ölçüde değiştirdiğini göstermişlerdir. yine aynı şekilde Bos-Mikich ve ark (1995) soğutmanın dışında vitrifikasyon solüsyonlarına 90-100sn gibi uzun süreli maruz bırakılırsa aktif fare oositlerinin büyük bir çoğunluğunun 2PN basamağında durduğunu (%30) ve kromozomal kondensasyonun meydana gelmediğini göstermişlerdir.

Damien ve ark (1990) tarafından gözleendiği gibi eğer hücre KPA'ya uzun süre maruz bırakılırsa gelişim potansiyeli kadar intrasellüler pH'da değişecektir. Pichering ve ark (1991) yetersiz bir süre DMSO'ya maruz kalan insan oositlerinin fertilizasyon oranlarının düştüğünü bulmuşlardır.

Çalışmamızda oositleri vitrifikasyon solüsyonuna 30-40sn maruz bıraktık. Buna rağmen %15'lik EG+DMSO+sükrozdan oluşan yüksek konsantrasyonlardaki vitrifikasyon solüsyonuna 40sn'yi aşan sürelerde (60-120sn) istem dışı olarak maruz bırakılan oositler hemen vitrifikasyon sırasında ya da çözme sonrası canlılıklarını kaybetmişlerdir. Bu durumu yaptığımız bir işlem hatası olarak kabul edip çalışmamızda değerlendirmeye almamamızla birlikte KPA'ya uzun süreli maruz bırakma durumunda meydana gelebilecek problemleri gözlemlemiş olduk.

Vitrifikasyonun başarısını etkileyen önemli faktörler sıcaklığın düşüş oranları ve vitrifikasyon solüsyonlarının soğutulmasıdır. Bu taşıyıcıların termal iletkenliği ve vitrifikasyon solüsyonlarının yükleme volümü bakımından dondurma işleminde kullanılan taşıyıcılar soğutma oranlarında önemli bir rol oynar. Oosit ya da embriyoların KPA solüsyonları ile yüklendiği çeşitli taşıyıcı sistemler vardır. Bu taşıyıcı sistemlerin çoğunun dezavantajı kontaminasyon kaynağı olan likit nitrojenle temas halinde olmalarıdır (Hredzak ve ark 2005). Örneğin; Açık sistemde LN<sub>2</sub> ile direkt temas vardır ve çok yüksek soğuma oranları elde edilir. Kapalı sistemde ise LN<sub>2</sub> ile oositler direkt temas etmezler ve oositler LN<sub>2</sub>'ye batırılmadan önce taşıyıcı içinde dış ortamla teması kesilecek şekilde kapatılır. Soğuma oranları standart dondurma strawlarında 4 460 °C/dk, OPS'lerde 16 340 °C/dk'dır. Çalışmamızda ise fibreplug adındaki yarı-kapalı sistem kullanılmıştır. Kullandığımız metal bloğun soğutma hızı 14 000 °C/dk'dır (Keskintepe 2010). Fibreplugtaki kancaya yaklaşık 1-3µl hacimde yükleme yapılarak yüksek soğutulma oranları elde edildi ve yarı-kapalı sistem kullanarak kontaminasyon riski önlenmeye çalışıldı. Ayrıca kapalı sistemlerin etkili olmasının bildirilmesine rağmen (Kuwayama ve ark 2005b), açık sistemlerin dezavantajlarını (hastalık riski ve kontaminasyon) elimine

etmek, fakat yüksek soğutma oranlarının devamını sağlamak için daha birçok araştırmaya ihtiyaç vardır (Bielanski ve ark 2000).

Valojerdi ve Salehnia (2005) fare MII oositlerini yavaş soğutma ile dondurdukları zaman çözme sonrası hasarlı bir mitokondri ve dağılmış bir ara filament bulmuşlardır. Aksine bu MII oositleri vitrifiye edildiği zaman hasar minimal olmuştur sadece ara filamentler etkilenmişlerdir ve bunlar ilk bölünme zamanına kadar yeniden organize olmuşlardır. Ayrıca yavaş soğutma yapılan oositlerde blastosist gelişmemiştir (Valojerdi ve Salehnia 2005).

Martino ve ark (1996) yüksek soğutma oranları kullanarak vitrifikasyon sonrası sığır oositlerinin blastosist basamağına gelişebilme yeteneğine sahip olduklarını göstermişlerdir.

Vitrifikasyon sırasında sağlanan yüksek soğuma oranları, vitrifikasyon solüsyonlarının çok küçük volümlerde kullanılması ile başarılmıştır. Bu volümlerin standart oosit ve embriyo kriyoprezervasyonunda kullanılan 0,25ml ile karşılaştırıldığında 1µl kadar az oldukları bilinir. Minimum volüm kullanarak soğuma hızının artırılması hasara sebep olan sıcaklık aralığının (-5°C ile +15°C arası) hızlıca geçilmesini sağlar (Martino ve ark 1996). Vitrifikasyon mikrolitre düzeyindeki volümlerde hücrelerin yüklenmesine izin veren küçük taşıyıcıların kullanılması ile gerçekleştirilir. Bunun için EM Grid (Martino ve ark 1996), OPS (Vajta ve ark 1998), Solid Surface Vitrification (Dinnyes ve ark 2000), Microdrops (Papis ve ark 2000), Cryotop (Hochi ve ark 2001), Nylon Mesh (Matsumoto ve ark 2001), Cryotip (Kuwayama ve ark 2005a) ve Cryoloop (Lane ve ark 1999) olmak üzere çeşitli metodlar vardır.

Martino ve ark (1996) yaptıkları bir çalışmada sığır oositleri için EM Grid kullanmışlar ve konvansiyonel strawlara nazaran daha yüksek gelişme potansiyeline ulaşmışlardır. Yine Hong ve ark (1999) ile Yoon ve ark (2003) EM Grid metodu kullanarak insan oosit vitrifikasyonundan başarılı gebelikler elde etmişlerdir.

Arav ve ark (2002) yaptıkları bir çalışmada oosit içeren küçük bir droplet vitrifikasyon solüsyonunu ince cam bir yüzeye yerleştirmiş sonra vitrifikasyonu gerçekleştirmek için likit nitrojene batırmışlar ve daha az konsantre vitrifikasyon solüsyonlarının küçük bir dropletinin (0,5µl) buz kristali oluşumu ve kırık hasarını önleyebileceğini gözlemlemişlerdir.

Vajta ve ark (1998) yapmış oldukları bir çalışmada küçük bir miktar vitrifikasyon solüsyonunda (1µl) sığır oositlerini tutmak için OPS'yi geliştirmişlerdir. Bu düşünce çekilmiş bir straw kullanarak örneklerin volümünü düşürmek içindir. Strawları ısıtmışlar ve elle çekmişlerdir. Sonra gittikçe incelen ucu kesmişlerdir. Sonuç olarak strawların çap ve duvar kalınlığı orijinal strawların yaklaşık yarısı kadar azalmıştır. Soğuma ve çözme oranları OPS'de diğer konvansiyonel strawlara göre daha yüksektir (sırasıyla 16 700°C/dk ve 13 900°C/dk) ve araştırmacılar daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Ayrıca Kuleshova ve ark (1999) da insan oositlerinin vitrifikasyonu için OPS kullanmışlar ve başarılı gebelikler elde etmişlerdir.

Morato ve ark (2008) sığır oositleri ile yaptıkları bir çalışmada Cryotop'un OPS'ye göre iç yapısını daha iyi koruduğunu bulmuşlardır. Kuwayama ve Kato (2000) ince bir propilen şerit kullanarak Cryotop'u (Kitazato Supply Co., Fujinomiya, Japan) geliştirmişlerdir. Cryotop ile birlikte

soğutma ve çözme oranları önemli ölçüde artmıştır ve 23 000°C/dk ve 42 100°C/dk'ye ulaşılmıştır (Kuwayama ve ark 2005a).

Ruvalcaba ve ark (2005) yaptıkları bir çalışmada taşıyıcı olarak Cryotop kullanılarak yapılan vitrifikasyon sonrası %90,1'lik canlılık oranı ve %34,1'lik bir gebelik oranı elde etmişlerdir.

Chian ve ark (2005) Cryotop'u modifiye ederek koruyucu bir kılıf uygulaması ile Cryoleaf'i (MediCult, Jyllinge, Denmark) geliştirmişlerdir. Cryotop ve Cryoleaf insan oosit vitrifikasyon başarısını büyük ölçüde arttırmıştır (Kuwayama ve ark 2005a). Kuwayama ve ark (2005a) Cryotip'i geliştirmişlerdir (Kitazato Supply Co, Fujinomiya, Japan). Temel olarak ısı ile kapatılarak çekilmiş straw tekniğidir. Soğuma ve çözme hızı Cryotop'tan daha düşüktür fakat Cryotip ile beraber termal hız başarılı bir vitrifikasyon için olabildiğince yeterlidir (Kuwayama ve ark 2005a).

Chian ve ark (2004b) Cryoleaf adlı açık sistem taşıyıcıda 180 adet oositi EG, PrOH ve süktroz kombinasyonunu kullanarak vitrifiye etmişlerdir. %93,9'luk bir canlılık oranı, %74,6'lık bir fertilizasyon oranı ve %20,4'lük bir implantasyon oranı ve hasta başına 7/15'lik bir klinik gebelik oranı (% 46,7) elde etmişlerdir.

Lane ve ark (1999) insan oositlerinin vitrifikasyonunda ilk defa Cryoloop kullanmışlardır (Cryoloop; Hampton Research, Laguna Niguel, CA., USA). Cryoloop, bir kulpa bağlı küçük naylon bir loop ve taşıyıcı olarak ta bir tüpten oluşur. Vitrifikasyon solüsyonunun içerisinde bulunan oosit ve embriyolar loop ucundaki kancada bir film oluşturarak asılı kalmışlar. Sonra sıvı nitrojene daldırılmışlardır. Vanderzwalmen ve ark (2000) bir ucu açık bir straw olan taşıyıcı Hemistraw'ı geliştirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada bu

taşıyıcılardan farklı olarak fibreplug kullandık. Yükleme yaptığımız Minimal volüm ve sağlanan aşırı soğuma ile yüksek soğutma hızları elde ettik. Oositleri (max 3 adet) ortalama 1,5µl'lik volümlerde fibreplug ucundaki kancaya transfer ettik. Kullandığımız kriyobloğun soğutma hızının 14 000 °C/dk olması ile birlikte vitrifikasyon öncesi 35°C'de olan oositler saklama sıcaklığı olan -196 °C'ye yaklaşık 1 sn'de ulaşmıştır. Bu da 231°C olan bu sıcaklık farkındaki 20 °C'lik zararlı sıcaklık aralığının (-5 - +15) 5 salisede geçildiği anlamına gelmektedir. Bu sayede hücre hasarına sebep olan sıcaklık aralığının son derece hızlı geçilmesi sağlanmıştır.

Memeli oosit kriyoprezervasyonu ile ilgili problemlerden biri organeller ve hücresel yapılarda yatmaktadır. Yapısal ve fonksiyonel soğuk hasarının öncelikli yeri membranlardır. Soğuk hasarı oosit membranındaki termotropik faz değişimlerinden kaynaklanır. Hücrelerden termal enerji uzaklaştıkça 2 tabakalı lipitteki moleküler hareket düşer. Bu komşu lipid moleküllerinin arasındaki etkileşime izin verir bu da daha akışkan likit kristal fazdan sert jel faza geçiş ile sonuçlanır (Arav ve ark 1996). Plazma membranı, zona pellusida, kortikal granüller, mikrotübüler iğler, mikrofilamentler ve kondanse kromozomlar gibi organeller düşük sıcaklıklardan etkilenirler (Saunders ve Parks 1999, Wu ve ark 1999). Kortikal granüller fertilizasyon sırasında polispermiyi bloklayan yapılardır. Dahası KPA maruziyetinin intrasellüler  $Ca^{+2}$  artışına sebep olduğu ve zona pellusidanın enzimatik modifikasyonlarına sebep olan kortikal granül materyalinin ekzositozunu tetiklediği gözlenmiştir ve bu sperm penetrasyonunu daha da güçleştirir (zona hardening; Larman ve ark 2006). Böylece IVF önemli ölçüde zorlaşır. Kortikal granüllerin prematüre salınışı polispermiyi bloklama zamanını bozar, polispermi oranları ve bunu takiben poliploidi artar (Fuku ve ark 1995).

Diğer bir araştırmada kriyoprezerve insan oositlerinde ICSI ve IVF karşılaştırılmış ve IVF'te daha düşük fertilizasyon oranları elde edilmiştir (Kazem ve ark 1995). Bu düşüncelerden yola çıkarak çalışmamızdaki tüm MII oositlere ICSI işlemi uygulanmıştır. IVF'teki düşük fertilizasyon oranlarının nedeni belki de zona sertleşmesine sebep olan kortikal granüllerin serbestleşmesi yüzünden olabilir (Ghetler ve ark 2006). Zona sertleşmesi, oosit aktivasyonunun başlaması ile birlikte kortikal granüllerin serbestleşmesi ve  $Ca^{+2}$ 'daki bir artış yüzünden KPA'lara maruz kalmasından kaynaklanabilir (Gardner ve ark 2007). Çeşitli araştırmacılar, gelişimsel başarısızlığı açıklayan soğutmanın zona pellusida üzerindeki etkilerini de incelemişler ve zonasız oositlerin daha yüksek sperm penetrasyon yeteneği olduğunu savunmuşlardır (Yuge ve ark 2003).

Oositler soğuğa oldukça hassastırlar hatta oda sıcaklığında bile hasarlanabilirler. Bu problem kısmen iğ aparatlarının hassasiyeti ve hücrelerin yüksek lipit içerikleri yüzündendir. Oosit, maternal DNA'sının sitoplazmadaki mayotik iğlerde asılı halde olması sebebiyle eşsiz bir hücredir ve DNA nüklear membranın koruyucu sınırları içinde değildir. DNA ve/veya mikrotübüllerin hasarı oosit kriyoprezervasyonunun sınırlı başarısını açıklar ve oositler oda sıcaklığına soğutulduğu zaman canlılıkları önemli ölçüde düşer, kromozomları bir arada tutan iğ aparatları parçalanır (Saunders ve Parks 1999, Wu ve ark 1999) ve soğuma sırasında kromatidler ayrılmaz bu da fertilizasyon sonrası ve embriyonik gelişimin sonunda aneuploidi (Sathananthan ve ark 1987) ya da poliploidi (Eroglu ve ark 1998) ile sonuçlanır.

II oositlerinin gelişimi sırasında lipit vezikülleri kadar mitokondri volümü de artar (Liebermann ve ark 2002a). Sathananthan (1994) yaptığı bir çalışmada düz ER-lipit kürecikleri-mitokondriden oluşan hücre

komplekslerinde retikulum-kürecik-mitokondri bağlantılarının varlığını göstermiştir ve aynı zamanda bu bağlantıların oosit soğuma ve dondurulması sırasında kırılabileceğini göstermişlerdir.

Abe ve ark (2005) vitrifiye edilmiş sığır oositlerinin rüptüre bir membran ile birlikte çok sayıda mitokondri ve vakuol içeren bu oositlerin sitoplazmasını göstermiştir. Bu düşük gelişim oranlarına sebep olur. Mitokondrinin şeklinin ve intrasellüler dağılımının hücre metabolizma düzeyi, üreme ve hücre siklusunun kritik periyodlarında gerekli olan temel enerjinin üretilmesi için farklılaşması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Matsumoto ve ark 1998).

Oosit-granüloza hücre gap junctionları, nüklear ve sitoplazmik mayotik yeteneğin düzenlenmesi için gereklidir ve oosit maturasyonu ile bunu takip eden embriyo gelişimi için hayati öneme sahiptir (Carabatsos ve ark 2000, Ali ve ark 2005), Ayrıca immatür oositlerin hücre iskeleti, KPA hasarına MII oositlerden daha hassastır (Magnusson ve ark 2008).

Oositler ovulasyonun normal bir şekilde meydana geldiği germinal vezikül (GV) ya da MII basamağında kriyoprezerve edilebilir. Oosit maturitesinin her iki basamağında da başarılı kriyoprezervasyonlar bildirilmiştir. Mayotik geçişler sırasında sitoplazmik değişiklik ve perivitellin boşluk değişimleri, RNA ve protein depolanması ve sentezlenmesinde, organellerin ve kortikal granüllerin yeniden düzenlenmesi ve göçünde, kumulus ooforus morfolojisinde değişiklikler vardır (Magnusson ve ark 2008). Hurt ve ark (2000) yaptıkları bir çalışmada EG kullanılarak yapılan vitrifikasyonun gap junctionların hasarlanmasına sebep olduğunu rapor etmişlerdir. İnsanda dahil olmak üzere çoğu memelinin mayotik iğleri

soğumaya karşı çok hassastır (Mandelbaum ve ark 2004, Yang ve ark 2010). Kriyoprezervasyon mayotik iğlerin oluşumunu bloklayarak mikrotübüllerin düzenlenişini etkileyebilir (Rojas ve ark 2004) bu da hücre ölümü ya da anormal gelişime sebep olabilir (Shaw ve ark 2000).

Oositlerin mikrotübüllerden oluşan mayotik iğleri  $\alpha$  ve  $\beta$  tübülün dimerlerinin polimerizasyonu ile düzenlenir. Mikrotübüller, mikrotübül organize edici merkezden şekillenir. Kromozomlar mayotik iğlerin ekvatorial düzleminde sıralanır ve tübülün dimerler hücre siklusunun değişik basamaklarında polimerize ve depolimerize olurlar. Mayotik iğler mayozun tamamlanması, 2. polar cisim oluşumu, fertilizasyon, 2PN göçü ve ilk mayotik iğlerin göçü gibi olaylar için çok önemlidir (Chen ve Yang 2009).

Hasarlı embriyo gelişiminin mayotik iğlerin ayrılması yüzünden olduğu düşünülmüştür. Rienzi ve ark (2004) yeniden oluşan mayotik iğlerin fonksiyonel kapasitesi hakkında endişeleri arttırmışlardır. Polscope analiz, bir non-invasive polarize ışık mikroskop görüntüleme sistemidir ve bütün oositlerin kriyoprezervasyon/çözme sırasında iğlerinin parçalandığını göstererek bu görüşü kanıtlamıştır ve bu nedenle bütün MII oositleri çözme sonrası periyod sırasında başarılı bir reformasyon geçirmiştir. Oosit viabilitesinin bir indikatörü olarak bilinen bir polscope tarafından iğlerin görüntülenmesine rağmen tübülün dimerlerin yoğunluğundaki çok hassas değişikliklerin iğlerin fonksiyonunu etkileyebildiği rapor edilmiştir (Bianchi ve ark 2005).

Oosit vitrifikasyonu için optimal mayotik basamağı belirlemede birçok çalışma yapılmasına rağmen sonuçlar tartışmalıdır. GV'den (Hochi ve ark 1998), GVBD (Barnes ve ark 1997), MII'ye (Men ve ark 2002) kadar değişen

maturasyon basamakları vitrifikasyon için en elverişli basamaklar olarak tanımlanmışlardır. Aksine bazı çalışmalar da mayotik basamağın kriyoprezervasyon sonrası oosit canlılığını etkilemediğini göstermiştir (Le Gal ve Massip 1999, Hurt ve ark 2000).

Lim ve ark (1991) yaptıkları bir çalışmada mayozun basamaklarına göre değişen farklı metodlar tarafından vitrifikasyon sonrası oosit canlılığını gözlemlemişler ve maturasyon sırasında oositlerin GV basamağı olarak bilinen basamağının MI (mayoz I) profazının diploten basamağından çıkışı olduğu ve I. polar cisim atılımının MII basamağına geçiş olduğu gibi nükleer değişikliklere maruz kaldığını bildirmişlerdir.

Vitrifiye edilmiş MII oositlerindeki ana hasar mikrotübül depolimerizasyonunu izleyen mayotik iğlerin dağılmasıdır (Shaw ve ark 2000, Men ve ark 2002, Rojas ve ark 2004). Bu nedenle GV oosit vitrifikasyonu bu problemi mayotik iğler bu basamakta düzenlenmiş olmadığından devre dışı bıraktığı için alternatif bir uygulamadır. Ancak GV oositleri sitoplazmik membrandaki hasar (Arav ve ark 1996), gap junction bütünlüğündeki hasar, kumulus hücreleri ve oosit arasındaki iletişimin bozukluğu yüzünden kriyoprezervasyona aşırı şekilde hassastır (Diez ve ark 2005).

Toth ve ark (1994) yaptıkları bir çalışmada dondurulmuş GV oositlerinin çözme sonrası nüklear maturasyonlarını tamamladığını bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda da MII oositleri (%36) ile karşılaştırıldığında donmuş-çözünmüş GV oositlerinin benzer canlılık oranlarına (%37) sahip olduğunu göstermiştir (Mandelbaum ve ark 1988). Ancak GV oositleri için sonraki maturasyon oranı düşüktür (%20). Mayotik iğlerin yokluğu ve GV oositlerinin membran permeabilitesindeki farklılıklar soğuk hasarı riskini azaltabilir (Tucker ve ark

1998). Bu çalışmalarda in vitro maturasyonda (IVM) mayotik iğlerde oluşacak bir anormallik gözlenmemesine rağmen fertilizasyon ve bölünme oranları anlamlı şekilde düşüktür. Aksine bazı araştırmacılar da oosit GV basamağında dondurulduğu zaman gelişimde bozukluklar olduğunu bildirmişlerdir (Stachecki ve ark 2004). Boisi ve ark (2002) taze GV oositlerdeki %71,6'lık orana zıt olarak GV basamağındaki donmuş-çözünmüş oositlerin sadece %2,5'unun MII basamağına ulaşınca sağlam bir iğ yapısı gösterdiğini bildirmişlerdir.

Liebermann ve ark (2002a) domuz oositlerinde yaptıkları bir çalışmada soğuyan lipidlerin hücre iskeletine olan negatif etkilerini incelemişler. 48 saatlik kültürdeki oositlerde donma-çözme olmadan santrifügasyon yoluyla lipidlerin yeniden dağılımını sağlamışlardır. Araştırmacılar hücre iskeleti yapılarının farklı özelliklerinden dolayı MII oositlerinin donma hasarına GV oositlerden daha dayanıklı olduğunu düşünmüşlerdir. Oosit maturasyonunun bu 2 basamağında mikrotübül ve mikrofilamentlerin konfigürasyonunun farklı olması önemli bir farklılıktır. GV oositlerinin hücre iskeleti elemanları düz ve serttir. Oysaki MII oositlerinin hücre iskeleti elemanları dalgalı ve esnektir (Allworth ve Albertini 1993).

İmmatür oosit kriyoprezervasyonu ile ilgili çok sayıda yayın vardır (Cha ve ark 1991, Tucker ve ark 1998, Kan ve ark 2004). Fakat başarı oranları düşüktür. Bu yüzden de son zamanlardaki klinik çalışmalar MII oosit kriyoprezervasyonuna odaklanmıştır.

Borini ve ark (2006) yaptıkları bir çalışmada donmuş MII oositlerinin canlılık oranlarını araştırmışlar ve %71,1'lik canlılık oranı, ICSI'yi takiben

%76'lık bir fertilizasyon oranı ve yüksek bölünme oranları elde etmişler fakat implantasyon oranları %5,2'de kalmıştır.

Çalışmamızda MII oositlerini vitrifiye etmemize rağmen işlem sırasında araya karışan GV oositlerinin çözme sonrası hiçbirisi MII basamağına ulaşmamıştır. Bu da bize GV oosite nazaran MII basamağındaki oositin vitrifiye edilmesinin daha uygun olduğunu göstermiştir. Çünkü MII oosit gelişim basamağı bakımından fertilizasyona GV oositten daha yakındır. Bu sayede vitrifikasyon ile ilgili problemlere ek olarak oogenez ile ilgili problemler aşılmış olunur.

Otoi ve ark (1995) yaptıkları bir çalışmada matür oositlerin donmaya immatür oositlerden daha dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Sonrasındaki blastosist aşamasına daha yüksek oranda ulaşmışlardır. Fakat KPA olarak sükroz eklendiği zaman immatür oositlerin MII basamağında dondurulmuş oositlere göre kriyoprezervasyon sonrası IVF'te daha yüksek oranlarda bölündüklerini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar gösteriyor ki farklı mayotik basamaklarda oositlerin kriyoprezervasyona toleransı KPA'nın tipine göre değişir ve çeşitli gruptan elde edilen sonuçların farklılığının sebebi bu olabilir.

2003 yılından önce oositler genelde embriyo kriyoprezervasyonu için geliştirilmiş metodlara dayanarak kriyoprezerve edilirdi. İlk elde edilen sonuçlar başarısızdı. Daha sonraları donma solüsyonlarının modifikasyonuna, permeabl ve non-permeabl KPA'ların konsantrasyonuna ya da çeşitlerine odaklanıldı. Birçok çalışma optimal bir vitrifikasyon prosedürünün nasıl olacağı üzerinedir. Herhangi bir kriyoprezervasyon prosedürünün amacı buz kristali oluşumu gibi bir hücre hasarını minimize etmektir. Bunu

kolaylaştırmak için kriyobiyoloji araştırmalarında değişik KPA konsantrasyonlarına ve KPA toksisitesini azaltmak için değişiklik gösteren maruziyet sürelerine odaklanılmıştır (Leibo ve Loskutoff 1993).

Fabbri ve ark (2001) yaptıkları bir çalışmada KPA'ya maruz bırakma süresinin ve non-permeabl KPA olan sükrozun konsantrasyonunu 0,2'den 0,3'e arttırılması ile kriyoprezerve oositlerin canlılık oranlarının %62'den %82'ye geliştiğini kanıtlamışlardır. Sükrozun daha yüksek konsantrasyonları ise dehidrasyonu arttırır ve buz kristalinin sebep olduğu iç hasarı riskini düşürür. Bu çalışma aynı zamanda Mandelbaum ve ark (1988)'nin çalışması ile tutarlı olarak kriyoprezervasyon öncesi kumulus hücrelerinin kısmi ya da tamamen uzaklaştırılmasının canlılık oranlarını etkilemediğini kanıtlamıştır. Aksine Imoedemhe and Sique (1992) kumulus hücreleri varolduğu zaman kumulus hücreleri ani şoktan oositi koruduğundan kriyocanlılıkta bir artış olduğunu rapor etmişlerdir ve çalışmalarında artmış sükroz oranlarını kullanmamışlardır.

Kumuluslu ya da kumulussuz memeli oosit kriyoprezervasyonu konusuna dair sonuçlar karşılaştırıldığında Trounson and Kirby (1989) kumulusun uzaklaştırılmasının kriyoprezervasyon sonrası oosit canlılık oranlarını düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Oysa Whittingham (1977) ve Mandelbaum ve ark (1988) kumuluslu ve kumulussuz kriyoprezerve fare ve hamster oositleri arasında canlılık oranları bakımından herhangi bir farklılık bulamamışlardır (Whittingham 1977, Mandelbaum ve ark 1988). Johnson ve Pickering (1987) fare oositlerindeki kumulusun varlığının DMSO'nun toksik etkilerini azalttığını ifade etmişlerdir ve Johnson (1989) kumulusların çözme sonrası hızlıca uzaklaştırılmasının kriyoprezerve fare oositlerinin fertilizasyon oranlarını daha iyi hale getirdiğini bulmuştur.

Fabbri ve ark (1998) kumulus kaplı oositlerde kumulussuz oositlere göre daha yüksek canlılık, fertilizasyon, embriyo oranları bulmuşlardır. Bu sonuçlar kumulus varlığında canlılık oranlarının arttığını göstermiştir. Çünkü kumulus KPA'nın toksik etkisine karşı daha koruyucu görev yapar.

Kumulus hücrelerinin dondurma-çözme sonrası oosit canlılığı üzerindeki tartışmalı etkilerine rağmen yararlı etkileri de bildirilmiştir (Imoedemhe ve Sique 1992, Im ve ark 1997). Imoedemhe ve Sique (1992)'ye göre kumulus hücrelerinin varlığı, çözme sonrası periyod sırasında KPA'ların uzaklaştırılması ve dengeleme periyodu sırasında KPA'ların hızlıca hücreye girişi ve çıkışı tarafından indüklenen ozmotik değişiklikler ve strese karşı koruyucu görevleri vardır. Bununla birlikte sağlam bir kumulus oosit kompleksinin kriyoprezervasyonu zordur. Çünkü oosit için optimal dengeleme zamanı küçük kumulus hücrelerinden farklıdır. Bizde çalışmamızda kumulus hücreleri ile oositin morfolojik ve fizyolojik olarak farklı olmaları sebebiyle KPA'ya karşı değişik permeabilite özellikleri gösterebileceği düşüncesinden yola çıkarak oositleri hyaluronidaz enziminden geçirerek kumulus hücrelerini vitrifikasyondan elimine ettik.

Vitrifikasyon prosesinde önemli basamaklardan birisi uygun ve en az toksik bir vitrifikasyon solüsyonunun seçimidir (Yavin ve Arav 2007). İlk vitrifikasyon çalışmalarında çok yüksek konsantrasyonlu KPA'lar kullanılmış ve bu nedenle çalışmalar kısıtlanmıştır. Daha güvenli vitrifikasyon solüsyonlarının gelişimi insandaki klinik uygulamalara ışık tutmuştur Soğutma oranlarının artması için dizayn edilen vitrifikasyon metodları geliştikçe, daha ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Yavaş soğutma tekniğine nazaran vitrifikasyon

solüsyonlarında kullanılan KPA'ların konsantrasyonu ve seçimi başarı oranlarını etkilemiştir (Mullen ve ark 2008).

İnsan oositlerinin DMSO ile başarılı bir şekilde dondurulmasına rağmen (Katayama ve ark 2003), fare oositlerinde yavaş soğutma ile yapılan önceki çalışmalar DMSO'nun mikrofilament organizasyonunu etkilediğini (Vincent ve ark 1990a) ve kromozomal anomalileri arttırdığını göstermiştir (Bouquet ve ark 1995). Aksine Johnson ve Pickering (1987) yaptıkları bir çalışmada DMSO'nun tübülindeki stabilize etkisini kanıtlamışlardır. Lucena ve ark (2006) DMSO'nun iç polimerizasyonunda yararlı bir etkiye sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. DMSO'nun bu avantaj ve dezavantajları bir araya getirilmiş ve insan oositleri için spesifik olan daha uygun bir KPA'nın araştırılması gerektiği vurgulanmıştır.

EG düşük toksisite özelliği ve hücrelere yüksek permeasyon özelliği ile vitrifikasyon solüsyonlarının önemli bir komponentidir. Bazı araştırmacılar tek bir KPA'nın konsantrasyonunu düşürmek için DMSO ya da PROH gibi diğer permeabl ajanları kombine kullanmışlardır. Bu işlem tek bir KPA'nın spesifik toksisitesini düşürür (Hiraoka ve ark 2004, Chian ve ark 2005, Isachenko ve ark 2006).

Ali ve Shelton (1993) toksisiteyi azaltmak için 5,5M EG ve 1M süktrozdan oluşmuş vitrifikasyon solüsyonu geliştirmişlerdir. Chen ve ark (2000) insan oositlerinin vitrifikasyonu için hazırlanmış bu solüsyonu kullanmışlar ve yüksek canlılık oranlarına ulaşmışlardır. Yine aynı şekilde Kuwayama ve ark (2005b) yaptıkları bir çalışmada Cryotop metodu ile oositleri kriyoprezerve etmişler ve KPA olarak EG ve süktroz kullanmışlardır. Vitrikiye edilen 64 oositten %90,8'lik canlılık oranı, %89,6'lık bir fertilizasyon

oranı, transfer başına %41,4'lük bir gebelik oranı elde etmişlerdir. Gebelik devamı ve canlı doğum oranı ise transfer başına %34,5'tir.

Yapılan çalışmada yüksek konsantrasyonlu KPA'ların toksik etkisini azaltmak için kombine bir karışım olarak EG+DMSO+sükroz kullandık. Optimizasyon çalışmasının 3 grubunda da belli oranlarda fertilizasyon elde ederek ilgili makalelerin verilerinde, tek bir KPA'nın kullanımı yerine kombine KPA kullanımının daha iyi sonuçlar verdiğini desteklemiş olduk

Sükroz gibi non-permeabl KPA'lar permeabl KPA'ların konsantrasyonunu düşürerek vitrifikasyon ve dehidrasyonu kolaylaştırır (Chen ve Yang 2007).

Çalışmalarda vitrifikasyon solüsyonlarında kullanılan artmış sükroz konsantrasyonlarının canlılık ve fertilizasyonu arttırmasına rağmen bunu takibeden implantasyon oranlarının (%5,2) ve gebeliklerin (transfer başına %9,7 embriyo) düşük olduğu gözlenmiştir (Borini ve ark 2006).

Borini ve ark (2006)'nın buldukları bu oranlar ile birlikte yayınlanan düşük oranları, taze oositler kullanılarak yapılan gebeliklerle karşılaştırılmıştır. Levi Setti ve ark (2006) %33 gibi yüksek düşük oranları gözlemişlerdir. Dehidrasyon basamağındaki yüksek sükroz oranları ile birlikte implantasyon döneminde gelişimsel yeteneğin niçin düştüğünün anlaşılması güçtür. Bianchi ve ark (2006) yükselmiş sükroz konsantrasyonlarının hızlı bir dehidrasyona sebep olacağı teorisinde bulunmuşlardır. Araştırmacılara göre 0,3M sükroz hücre viabilitesi için zararlı olduğuna inanılan eşik değerini aşar. Oluşan hücre büzülmesi oosit için travmatik olabilir.

Hangi KPA kullanılırsa kullanılsın toksisiteyi ve ozmotik hasarı minimize etmek için KPA konsantrasyonunun düşmesi kriyocanlılığı ve ardından gelen gebelik oranlarını geliştirmek için çok önemlidir. Örneğin, EG konsantrasyonunun 6,8M'dan 5M'a düşmesi blastosist oranlarını %24'den %50'ye çıkarır (Kuwayama ve ark 2005a).

Son zamanlarda oosit ve embriyoların %15 EG ve %15 DMSO ya da PROH ve 0,5M sükrozdan oluşmuş konsantre vitrifikasyon solüsyonları kullanılarak minimum volüm metodu ile vitrifiye edilebildiği bildirilmiştir. Bu strateji vitrifikasyon solüsyonlarının toksisitesini azaltır. (Chian ve ark 2005, Hiraoka ve ark 2004).

%7,5 EG ve % 7,5 DMSO ile 0,5M sükrozdan oluşan kombine bir solüsyon taze ve vitrifiye oositleri karşılaştırmak için yapılan çalışmalarda kullanılmıştır. Vitrifiye edilen oositler 1 saat bekletilip çözülmüş ve taze oositlerle aynı zamanlarda insemine edilmiştir. %96,7'lik bir canlılık oranı elde edilmiştir. Bunu takibeden fertilizasyon oranları %76,3'tür ve taze oositlerle arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır (%82,2). Vitrifiye edilmiş grupta %40,8'lik implantasyon oranları ile birlikte iyi blastosist gelişimleri gözlenmiştir (20/49). Taze grupta tek bir ET gerçekleştirilmiştir (Cobo ve ark 2008). Bu çalışmada Cobo ve ark (2008) 3 yavaş soğutma metodunu (PrOH 1,5M+0,2M sükroz; PrOH 1,5M+0,3M sükroz; PrOH 1,5M+0,3M sükroz) vitrifikasyon metodu ile karşılaştırmışlar ve mayotik iğlere etkilerini değerlendirmişlerdir. Vitrifiye edilen oositlerin daha yüksek canlılık oranları göstermelerine rağmen yavaş soğutmaya göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. 4 protokolün tamamında da normal mayotik iğler gözlenmiştir. Bununla birlikte bir fiksasyon ya da boyama tekniği ile repolimerizasyonun dinamikliğini göstermek mümkün olmamıştır.

Ali ve Shelton (1993) toksisiteyi azaltmak için 5,5M EG ve 1M süktrozdan oluşmuş vitrifikasyon solüsyonu geliştirmişlerdir. Chen ve ark (2000) insan oositlerinin vitrifikasyonu için hazırlanmış bu solüsyonu kullanmışlar ve yüksek canlılık oranlarına ulaşmışlardır. Kuleshova ve ark (1999) da yaptıkları bir çalışmada 17 insan oositini %40 EG ve 0,6M süktroz kullanarak OPS ile vitrifiye etmişler ve ilk canlı doğumu bildirirken Yoon ve ark (2003) da ilk geniş çaplı insan oosit vitrifikasyonunu yayınlamışlardır. Çalışmacılar 474 kumulus oosit kompleksi (matür ve immatür) 5,5M EG ve 1M süktroz kullanarak vitrifiye etmişlerdir. Maksimum soğutma oranları elde etmek için oositler EM gride yüklenmişlerdir. Araştırmacılar %68,7'lik bir canlılık oranı, %71,7'lik bir fertilizasyon oranı ve %6,4'lük bir implantasyon oranı ve transfer başına %30 klinik gebelik ve canlı doğum oranı elde etmişlerdir (%21,4). Bununla beraber Porcu ve ark (2000) insan oositleri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada 0,2 M'dan daha yüksek süktroz konsantrasyonu ile birlikte 1,5M PROH kullanmışlar ve çözme sonrası %59'luk bir canlılık oranı elde etmişlerdir.

Farklı çalışmalarda vitrifikasyonun son basamağında değişik molaritelerde süktroz ilaveleri yapılmaktadır. Bizde çalışmamızda insan oositlerinin morfolojik verilerini göz önüne aldığımızda vitrifikasyon solüsyonuna 1M süktroz ekledik.

Devitrifikasyonu önlemek için çözme hızı da önemlidir. EM Grids, Cryoloop ya da Cryotop gibi minimum volüm metodları dilüsyon medyumlarının içine batırılır. Oositler dilüsyon medyumunu ile hemen temasa geçerler (Chen ve Yang 2007). Vitrifiye edilmiş oositler çözme sonrası ozmotik strese daha hassastırlar. Çalışmamızda bu düşüncüyü doğrulamıştır. İşleme

aldığımız oositlerden bazılarında vitrifikasyon işlemi sırasında hacimsel olarak yavaş bir büzülme ve şişme gerçekleşse bile aynı oositin çözme işlemi sırasında ani hacim artışı şekillenmişse ilerleyen dakikalar içerisinde hücreler patlamış ve canlılıklarını kaybetmişlerdir. Ozmotik bir tampon olarak süktroz içeren basamaklı bir dilüsyon, permeabl KPA'lardan kaynaklanan aşırı şişmeyi önlemek için yaygın olarak kullanılır.

Bianchi ve ark (2006) yaptıkları bir çalışmada 0,2M süktroz ilaveli 1,5M PrOH'da oositleri dondurmuşlar ve oositleri 0,3M süktroz içeren azalan konsantrasyonlardaki medyumlara maruz bırakarak çözme sonrası oositleri rehidrate etmişlerdir. 403 çözünmüş oositten bir grup %75,9 oranında canlılık göstermişler ve ICSI sonrası fertilizasyon oranları %76,2 bulunmuştur. %13,5'lik bir implantasyon oranı ile birlikte gebelik oranları ET başına %21,3 olarak rapor edilmiştir. Bu metod kullanılarak elde edilen düşük oranları (%11,8) ise taze oositlerden elde edilen embriyo oranları ile (%10,3) benzerdir.

Chen ve Yang (2009) yapmış oldukları bir çalışmada oositleri 15 dk %7,5 EG, %7,5 DMSO ve %20 SSS'den oluşan dengeleme solüsyonunda beklettikten sonra 1dk %15 EG ve %15 DMSO ve 0,5M süktrozdan oluşan vitrifikasyon solüsyonuna maruz bırakmışlardır. Vitrikiye edilen oositleri Cryotop'a yükleyip LN<sub>2</sub>'de saklamışlardır. Çözme işleminde Cryotop doğrudan 1M süktroz içeren solüsyonda 37°C'de 1 dk arkasından 0,5M ve 0,25M süktrozda oda sıcaklığında 3'er dk bekletilmiştir. 2 saatlik bir inkübasyon sonrası insemine edilen oositlerde %95'lik bir canlılık oranı ve %33-57'lik bir gebelik oranı elde etmişlerdir.

Çalışma gruplarında kullandığımız farklı süktroz oranlarını karşılaştırdığımızda insan oositleri için 0,5M'dan başlayıp kademeli olarak

düşen süroz oranlarının %70'lik bir fertilizasyon oranı verdiğini bulduk. Oysa ki 1,25M sürozdan başlayan Grup III oositleri çözme sonrası düşük fertilizasyon oranlarına sahiptir (%28).

Oositlerin ozmotik şişmeye olan hassasiyeti iyi bilinir. Ozmotik şişme kriyoprezerve hücrelerden KPA'ların uzaklaştırılması sırasında meydana gelir. Dahası kriyoprezerve hücreler çözme sonrası ozmotik şişmeye taze oositlerden daha hassastır (Liebermann ve ark 2002a).

Çözme, KPA'ların dilüsyonu ve kriyoprezerve oositlerin rehidrasyonu önemli basamaklardır. Çözme sırasında dejenerasyonu önlemek için ve ozmotik şoku minimize etmek için optimal bir metoda ihtiyaç olduğu ifade edilmektedir. (Coticchio ve ark 2007).

Chen ve ark (2005) yaptıkları bir çalışmada çözme sonrası 3 saatlik bir inkübasyon süresinin ve inkübasyon periyodunun önemini ileri sürmüşlerdir. Bir çalışmada 2 saatlik inkübasyonla birlikte mükemmel gebelik oranları rapor edilmiştir (Kuwayama ve ark 2005a).

Rienzi ve ark (2004) tarafından 56 MII oositinde polscope optics kullanılarak iğlerin gösterilmesi sağlanmıştır. İğler KPA solüsyonlarında bozulmadan kalmıştır. Fakat çözme sonrası iğler sadece çözme solüsyonunda canlı kalan %31,3 oositte saptanmıştır. 1. KPA'nın uzaklaştırılmasından sonra bütün canlı oositlerde iğ depolimerizasyonu meydana gelmiştir. Bununla birlikte iğler 37°C'de 3 saat inkübasyondan sonra bütün oositlerde yeniden düzenlenmişlerdir.

Chen ve ark (2001) yaptıkları bir çalışmada vitrifiye edilmiş fare oositlerinin çözme sonrası hemen ya da 1 saatlik inkübasyonundan sonra döllenenmesi sonucu oluşan fertilizasyon ve blastosist oranları kontrol örneklerinkinden önemli ölçüde düşüktür. Fakat 2-3 saat inkübasyondan sonra döllendikleri zaman gelişme göstermişlerdir.

Gook ve ark (1993) yaptıkları bir çalışmada 1 saatlik inkübasyonda normal iğ yapısı %81 olan kontrol örneklerle karşılaştırıldığında çözme sonrası oositlerin %60'ında normal iğ yapısı gözlemişlerdir.

Ciotti ve ark (2009) yaptıkları bir çalışmada iğ yapısının yavaş soğutmaya nazaran vitrifikasyonda daha hızlı toparlandığını rapor etmişlerdir. Eroglu ve ark (1998) yaptıkları bir çalışmada kriyoprezerve edilen fare oositlerinin çözme sonrası hemen döllenenmesinin iğlerin düzenlenmesinde, 2. polar cisimcik atımında bozukluklara ve digyny (diploid ovum) oranında artışlara sebep olduğunu gözlemişlerdir. Matür oositler spesifik iğ sistemi ile MII basamağında durmuşlardır. Fertilizasyon sonrası bir spermin girişi ile intrasellüler  $Ca^{+2}$  artışı gerçekleşir ve sitostatik faktörler azalır (Edwards ve Brody 1995). Oosit 2. mayozunu tamamlar ve 2. polar cisimcik atılır. Matür oosit uygun zamanda fertilize olmuş olmalıdır. Yoksa dejenere olur. Matür oositlerin geciken inseminasyonları gelişen embriyoların sağlığını tehlikeye atar (Gook ve ark 1994).

Chen ve ark (2000b) iğlerin immünofloresans boyanması ile fare oositlerinin intrasellüler kriyohazarını incelemişlerdir. Çözme sonrası 1-3 saat inkübasyonun normal iğ yapısına sahip oosit oranlarını arttırdığını gözlemişlerdir. İğler KPA'lara ve düşük sıcaklıklara çok hassastır. Çözme sonrası hemen analiz edilen oositlerde şiddetli organizasyon bozukluğu ve

iğlerin kayboluşu gözlenir (Eroğlu ve ark 1998, Chen ve ark 2000b, Chen ve ark 2001). 37°C'de 1-3 saatlik inkübasyon ile dondurma ve çözme sonrası zaman aralıklarına bağlı olarak çeşitli basamaklarda iğ yağısının yeniden eski haline gelmesi ile sonuçlanır. Chen ve ark (2000b) yapmış oldukları bir çalışmada vitrifiye edilmiş fare oositlerinde çözme sonrası 1 saatlik inkübasyonun kromozom ve iğ yapısını düzelttiğini gözlemlemişlerdir. Aksine Chen ve ark (2001) yaptıkları bir çalışmada 2 ya da 3 saatlik bir inkübasyonun 1 saatlik inkübasyona göre daha yüksek yüzdelerde normal iğ yapısı gösterdiğini kanıtlamışlardır. Bizde yukarıdaki inkübasyon süreleri ile ilgili açıklamaları göz önüne alarak 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatörde yağ altı (parafin oil, LifeGlobal) 75µl'lik embriyo kültür medyumunu (Global, LifeGlobal) içerisinde inkübasyon süresini 3 saat uyguladık.

Çalışmalar embriyo kalitesini geliştiren ve implantasyon oranlarını arttıran modifikasyonları keşfetmeyi gerektirir. Paynter ve ark (2005)'na göre in-vitro ortam ve dondurma-çözme solüsyonlarının sıcaklıkları ile birlikte oositlerin solüsyonlardaki bekleme süresi de çok önemlidir. Al-Hasani ve Diedrich (1995) dengeleme solüsyonlarına 10dk maruz bırakmanın, insan oositlerinin canlılık oranlarını arttırmak için yeterli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bazı araştırmacılar oda sıcaklığında oositleri KPA'lara maruz bırakmışlardır (Chen ve ark 2000a, Chian ve ark 2005, Kuwayama ve ark 2005b). Fakat araştırmacıların bazıları da 35-37°C'de (Vajta ve ark 1998, Yoon ve ark 2003) araştırmalarını gerçekleştirmişlerdir. Bir kısım araştırmacı da çözmeyi oda sıcaklığında ve dilüsyonu 37°C'de gerçekleştirmiştir (Lucena ve ark 2006, Cobo ve ark 2008). 37°C'de dilüsyon, prosedür sırasında iğlere daha az hasar verir (Ciotti ve ark 2009).

Daha yüksek sıcaklıklar hücre membranından permeabl KPA'ların geçişini arttırır. Fakat aynı zamanda toksisite de artar. Bu nedenle 37°C'de 2-3dk dengeleme solüsyonlarına maruz bırakılırlar ve vitrifikasyon solüsyonlarında da 20-30sn bekletilirler (Vajta ve ark 1998, Yoon ve ark 2003). Aksine oda sıcaklığında dengeleme solüsyonu için 5-15dk vitrifikasyon solüsyonu için 30-60sn'nin yeterli olduğu düşünülür. (Chen ve ark 2000a, Chian ve ark 2005, Kuwayama ve ark 2005a). Biz ise çalışmamızda insan oositlerinin dengeleme solüsyonlarına 3,5dk maruz bırakılmasının yeterli olacağı fikrine sahibiz. 3 gurubumuzun dengeleme solüsyonunda geçen sürelerini incelediğimizde döllenme oranı en yüksek grubun toplam süresi 3,5dk olan grup olması sebebiyle sürenin yetersiz olmasının KPA'nın hücreye nüfusunu azaltacağı fazla olmasının ise toksisiteyi arttıracığı görüşündeyiz.

Konsantre KPA'lara uzun süre maruz bırakmak toksik bir etki oluşturur. 120sn vitrifikasyon solüsyonlarında bekletilen insan oositleri 60sn vitrifikasyon solüsyonunda bekletilenden daha düşük fertilizasyon ile sonlanır (Chen ve ark 2000a). Wood ve ark (1993) yaptıkları bir çalışmada yüksek konsantrasyonlu KPA'lara uzun süre maruz bırakmanın fare oositlerinde canlılık oranlarını önemli ölçüde değiştirdiğini göstermişlerdir. Ayrıca Bos-Mikich ve ark (1995) soğutmanın dışında vitrifikasyon solüsyonlarına 90-100sn gibi uzun süreli maruz bırakılırsa aktif fare oositlerinin büyük bir çoğunluğunun 2PN basamağında durduğunu (%30) ve kromozomal kondensasyonun meydana gelmediğini göstermişlerdir.

Damien ve ark (1990) tarafından gözleendiği gibi eğer hücre KPA'ya uzun süre maruz bırakılırsa gelişim potansiyeli kadar intrasellüler pH'da değişecektir. Pichering ve ark (1991) yetersiz bir süre DMSO'ya maruz kalan insan oositlerinin fertilizasyon oranlarının düştüğünü bulmuşlardır.

Çalışmamızda oositleri vitrifikasyon solüsyonuna 30-40sn maruz bıraktık. Buna rağmen %15'lik EG+DMSO+sükrozdan oluşan yüksek konsantrasyonlardaki vitrifikasyon solüsyonuna 40sn'yi aşan sürelerde (60-120sn) istem dışı olarak maruz bırakılan oositler hemen vitrifikasyon sırasında ya da çözme sonrası canlılıklarını kaybetmişlerdir. Bu durumu yaptığımız bir işlem hatası olarak kabul edip çalışmamızda değerlendirmeye almamamızla birlikte KPA'ya uzun süreli maruz bırakma durumunda meydana gelebilecek problemleri gözlemlemiş olduk.

Oosit dondurmanın zamanlaması ve çözme takiben inseminasyon, tekniğin başarısını maksimize etmek için önemlidir. Parmegiani ve ark (2008) oositlerin toplandıktan sonra 2 saat içinde dondurulmasının embriyo kalitesi ve klinik sonuçları arttıracığını rapor etmişlerdir. Çözünmüş oosit başına düşen klinik gebelik oranları oosit toplandıktan sonra 3 saat içinde dondurulursa %2,9 eğer toplandıktan 2 saat sonra dondurulursa %7,3 oranındadır. Dozortsev ve ark (2004) yaptıkları bir çalışmada insan oositleri için ICSI'nin optimal zamanının hCG verildikten 37-41 saat sonra yapılması gerektiğini gözlemişlerdir. Bu fertilize oositler en yüksek implantasyon oranlarına ulaşmışlardır. Bu nedenle fertilizasyon için optimal süreyi seçmek iğlerin yeniden toparlanmasını ve oositin yaşlanmasını da dikkate alarak başarılı bir oosit kriyoprezervasyonu için çok önemli olduğu anlaşılmıştır (Dozortsev ve ark 2004).

Oositin toplanması genellikle hCG'den 35 saat sonra gerçekleşir. Oositlerin kriyoprezervasyonu oositler toplandıktan sonra 2 saat içinde gerçekleştirilir. Yavaş dondurma protokolü için donma öncesi dengeleme süresi ve çözme sonrası dilüsyon zamanı yaklaşık 1 saattir. ICSI, çözme sonrası 3 saat içinde (hCG sonrası 41. saat) gerçekleştirilir (Chen ve ark 2003, Chen ve

ark 2005). Vitrifikasyon, dengeleme ve dilüsyon metodu için 10dk yeterlidir. ICSI genellikle çözme sonrası 2 saat içinde gerçekleştirilir (hCG'den 39 saat sonra) (Lucena ve ark 2006, Cobo ve ark 2008). Bu nedenle donmuş-çözünmüş oositin inseminasyon zamanı optimal bir süredir. Bizde çalışmamızda oositleri toplandıktan 2 saat sonra vitrifikasyon işlemine aldık.

Cobo ve ark (2008) son zamanlarda yaptıkları çalışmada oosit vitrifikasyonundan elde edilen gebelik oranlarının taze oositler kullanarak elde edilen gebelik oranları ile benzer olduğunu rapor etmişlerdir. Aksine Liebermann ve ark (2002b) çözme sonrası canlılığın, yaşlı insan oositleri ya da başarısız fertilize oositlerin ulaşmış olduğu canlılık oranlarından daha az olduğunu bildirmişlerdir. Vitrifikasyonun güvenilirliğinin değerlendirilmesi başka bir problemidir. Çünkü başarıyı destekleyen sonuçlar canlı doğumlar ve bebeklerin sağlığıdır. Bunun değerlendirilmesi zordur ve literatürde bununla ilgili bilgiler yetersizdir. İnsan oosit ve embriyoları ile ilgili araştırmalardaki kısıtlamalar bu çalışmalarla ilgili daha sonraki gelişmelerin değerlendirilmesini engellemiştir (Yuge ve ark 2003).

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hücre, doku ve kısmi olarak organların farklı amaçlar için dondurularak saklanması günümüzde yaygın hale gelmiştir. Kriyoprezervasyon uygulamaları fizyolojik olmayan ve ciddi ısı ile osmotik değişikliklere ihtiyaç duyan güncel laboratuvar uygulamalarıdır.

Kadınların toplumdaki yerinin hızla değişmesi, kariyer yapan kadın sayısındaki artma, evlenme yaşının ilerlemesi gibi nedenlerle çocuk doğurma planlarını erteleyen çift sayısı da giderek artmaktadır. Kadın yaşının ilerlemesiyle birlikte yumurtalık rezervi azalmakta ve bunun sonucunda da doğurganlık potansiyeli düşmektedir. Özellikle ailede erken menopoza öyküsü, geçirilmiş yumurtalık cerrahisi, kemoterapi veya radyoterapi öyküsü olan kadınlarda, ailesinde yumurtalık kanseri, meme kanseri öyküsü olan hastalarda, turner sendromu gibi genetik hastalıklar, kist veya endometriozis gibi tekrarlayan hastalıklara sahip kadınlarda, endometriozisin tedavisi için ovaryumların alınması veya genital organ kanserleri gibi erken yaşta infertiliteye neden olan hastalıklarda fertilitenin devamı için kriyoprezervasyon uygulamaları yeni ufuklar açmıştır.

İnsan gamet hücrelerinin kriyoprezervasyonunun YÜT'te önemli bir işlevi vardır. Bu teknik ovarial stimülasyonu sonucunda hastaların yüksek

oranlarda gonadotropinlere maruz bırakılmadan gebelik oranlarının arttırılmasında oldukça etkilidir. Kanser gibi hastalıklarda tüp bebek tedavisi sonrası elde edilen oositlerin döllenmesini takiben iyi kalitede artan oositler doktor ve eşlerin birlikte karar vermesiyle dondurulabilir. Eğer taze embriyo transferi yapılan siklusta, gebelik oluşmazsa dondurulan oositler çözülür ve döllenerek bu tip anne adayına herhangi bir hormon tedavisi yapılmaksızın transfer edilebilir.

İnsan gamet hücrelerinin çeşitli nedenlerden dolayı dondurulması ihtiyacına karşılık vitrifikasyon yöntemi YÜT’te bir çözüm haline gelmiştir.

Endikasyonu konulmak şartıyla kadına ait oosit, erkeğe ait sperm hücrelerinin, embriyoların ve çeşitli dokuların dondurularak saklanabilmesi, yıllar sonra ihtiyaç halinde kullanma olanağı sağladığı için gerek hastalar gerekse tüpbebek teknolojisinin gelişimi açısından çok önemlidir. Yapılan çalışmalar sonucunda, vitrifikasyon denilen dondurma sistemi geliştirilmiştir. Vitrifikasyonda, buz kristallerinin hiç şekillenmeden camsı bir durum oluşturularak hücrelerin, dokuların ve kısmi olarak organların direkt olarak sıvı azot içerisine daldırılmasıyla dondurulmaları sağlanmaktadır. Bu yöntemle yukarıda adı geçen yapılar minimum hasarla yıllarca saklanabilmekte ve ihtiyaç halinde kullanılabilir.

Dondurma ve çözmenin hücre üzerinde ayrı ayrı ve beraber olumsuz etkileri olduğu bilinmesine karşın çok güçlü bir endikasyon alanının bulunmuş olması işlemin yapılmasını zorunlu kılmaktadır.

Çalışmamızda vitrifikasyon sonrası matür oositlerin işlemde ne kadar etkilendiğinin ortaya konmasında değerlendirme unsuru olarak fertilize olma

parametresini kullandık. İnfertil hastaların işlem sonrası artan oositlerini değişen yüzdelerde solüsyonlara farklı sürelerde tutarak vitrifikasyonlarını gerçekleştirdik ve arkasından dondurmuş olduğumuz oositleri farklı molaritelerdeki süzkroz içeren çözme solüsyonlarına maruz bıraktık.

Bu amaç için hazırlanan modellemelerde vitrifikasyon ve çözme için farklı süreler ve yüzdeler kullanıldı ve sonuçlar oosit çapı, alan/ hacim oranları gibi morfometrik gözlemler ve fertilizasyon bulguları ile değerlendirildi. Buna göre Grup I %3,75 - %5 - %7,5 dengeleme solüsyon oranındaki 3,5dk süreyle ve çözme solüsyonundaki 0,5M - 0,2M süzkroz oranıyla morfometrik analizde bahsedilen parametrelerle ilgili olarak vitrifikasyon öncesi ve sonrası ölçümü yapılan oositlerde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir ve en yüksek fertilizasyon oranını vermiştir.

Gruplararası karşılaştırmalarda vitrifikasyon solüsyon yüzdelerinin toksik etki oluşturmayacak en yüksek konsantrasyonda seçilmesi gerektiği düşüncesi ile birlikte insan oositlerinin diğer türlerin oositlerine göre soğuğa daha hassas olduğu bilgisi ışığında vitrifikasyon solüsyonlarının yüksek yüzdelerde kullanılması durumunda maruziyet süresi azaltılmalıdır.

Vitrifikasyon tekniği ile oosit dondurma günümüz klinik verilerine dayanarak artmış çözme sonrası yaşam ve başarı oranları ile insan gamet ve embriyolarının kriyoprezervasyonunda tercih edilmesi gereken bir metod olarak nitelendirilmiştir.

Ek olarak her ne kadar günümüze kadar doğan bebeklerde tüp bebek yöntemiyle doğan bebeklere göre olumsuz bir etkiye rastlanmamakta ise de vitrifikasyon ile elde edilen hücrelerin genetik yapıları hakkında yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

Bu verilerin çok yakın gelecekte çözümlenmesiyle birlikte vitrifikasyon yöntemi klinik tüp bebek laboratuvarlarında rutinde kullanılan dondurma tekniği olarak yerini alacaktır.

## **6. ÖZET**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### **Kadın Gamet Hücresinde Optimal Vitrifikasyon Araştırması**

**“Aslıhan ŞAYLAN”**

**Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ KONYA-2011**

İnsan oosit, sperm, embriyo ve ovarial dokunun endikasyonu konmak şartıyla dondurularak saklanabilmesi gerek hastalar gerekse tüp bebek teknolojisinin gelişimi

açısından büyük önem taşımaktadır. Vitrifikasyon, krioprotektan kullanılarak materyalin ve sıvıların yüksek soğutmada buz oluşturmada camı bir faza geçtiği yöntemdir. Oositlerin büyüklüğü, şekli, geçirgenliği, kalitesi, ait olduğu tür ve gelişim dönemi başarılı bir dondurma için önemli özelliklerdir. İnsan oositlerinin dondurulmasında kullanılan kriyoprotektif ajanlar soğuk şoku ve donma esnasında gelişen diğer hasarlara karşı koruma sağlarlar. Kriyoprotektanların optimum ilave oranları ve maruz bırakma süreleri türe özgü olmakta ve spesifik hücre parametrelerinin bilinmesini gerektirmektedir.

112 adet insan MII oositlerinde yapmış olduğumuz çalışmada vitrifikasyon işlemi için oositler, her bir grup için farklı dengeleme solüsyon yüzdelere, dengeleme solüsyonuna maruz bırakma sürelerine ve çözme solüsyonundaki sükröz molaritelerine göre 4 gruba ayrılmışlardır. Grup I oositleri dengeleme solüsyonu olarak HEPES bazlı EG+DMSO'dan oluşan %3,75 - %5 - %7,5'luk solüsyonlarda 3,5dk, Grup II oositleri %1,37 - %3,75 - %7,5'lık solüsyonlarda 7-9dk, Grup III oositleri %3,75-%5-%7,5'luk solüsyonlarda 7-9dk, Grup IV oositleri ise %1,37 - %3,5 - %5 - %10'luk solüsyonlarda 3,5 dk bekletilmiştir ve arkasından her grubun oositleri 30-40sn vitrifikasyon solüsyonunda tutularak fibreplug'a yüklenip sıvı azota atılmıştır. 2 saat sonra sıvı azottan çıkarılan Grup I oositleri 0,5M - 0,2M, Grup II oositleri 0,5M - 0,2M, Grup III oositleri 1,25M - 0,6M - 0,3M, Grup IV oositleri ise 1,5M - 0,4M - 0,2M HEPES bazlı sükröz ilaveli çözme solüsyonlarından sırasıyla molaritesi çoktan aza doğru 5dk içerisinde geçirilmiştir. Tüm oositlere 3 saatlik bir inkübasyon sonrası ICSI işlemi uygulanmış olup 18-20. saat 2PN kontrolleri yapılmıştır. Oositler vitrifikasyon öncesi ve çözme sonrası morфометrik ve fertilizasyon oranları açısından değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmede Grup I'in diğer gruplara göre yüksek fertilizasyon oranlarına sahip olduğu, Grup III'te ise sadece oosit çapında vitrifikasyon öncesi ve çözme sonrası ölçümlerde istatistiksel farklılık gözlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** KPA; zaman; vitrifikasyon; oosit morфометrisi; fertilizasyon.

## 7. SUMMARY

### A Research on Optimization for Female Gamete Vitrification

It is very important to freeze and store human oocyte, sperm, embryo ve ovarian tissue when there is an indication. This importance is for both IVF technology and patient both. During vitrification with the support of cryoprotectant mediums materials just get into a glass form without ice forming. There are some parameters which effect a proper vitrification such as oocyte dimesion, permeability, quality, species and stage of development. Croprotectants preserve human oocytes from cold shocking and cold injury effects. The dosage and timing of cryoprotectants are specific to target species and their cells, with the knowledge of cell properties.

We worked on 112 MII phase human oocytes . We prepared 4 groups according to cryoprotectant and buffer solutions concentration , duration and thawing sucrose molarity. The buffer solutions (HEPES buffered EG+DMSO) for Group I is %3,75 - %5 - %7,5; 3,5 minute for Group II is %1,37 - %3,75 - %7,5; 7-9 minute for Group III %3,75-%5-%7,5; 7-9 minute and for Group IV %1,37 - %3,5 - %5 - %10; 3,5 minute , after this oocytes were placed for 30-40 seconds in vitrification solutions, loaded to fibreplug and placed in liquid nitrogen. After two hours of liquid nitrogen storage, oocytes were placed in decreasing HEPES buffered sucrose thawing solution as; Group I 0,5M-0,2 M, Group II 0,5M-0,2 M, Group III 1,25M- 0,6 M- 0,3 M and Group IV 1,5-0,4-0,2M. To all oocytes after 3 hours of incubation ICSI was performed, 2PN controls were done at 18-20 hours. Oocytes were evaluated according to pre and post vitrification on morphometric parameters and fertilization rates were documented. As a result Group I is superior for fertilization rates while Group III has statistical significantly higher oocyte diameters in pre and post vitrification timings.

**Key Words:** CPA; time; vitrification; oocyte morphometry; fertilization.

## 8. KAYNAKLAR

1. Abe Y, Hara K, Matsumoto J, Kobayashi H, Saada H, Ekwall H, Martinez HR, Sato E. Feasibility of a nylon mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. Biol Reprod. 2005;72:1416-20.

2. Agca Y. Cryopreservation of oocytes and ovarian tissue. *ILAR*. 2000;41:207-220.
3. Alesi R. Infertility and its treatment- an emotional roller coaster. *Aust Fam Physician*. 2005;34:135- 138.
4. Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Human Reproduction*. 1987;2:695-700.
5. Al-Hasani S, Diedrich K. Oocyte storage. In Grudzinskas JG, Yovich JL (ed). *Gametes - The Oocyte*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1995.
6. Ali A, Oaradis F, Vigneault C, Sirard MA. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev*. 2005;71:358-367.
7. Ali J, Shelton JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil*. 1993;99:471-477.
8. Ali S, Shelton S. Development of vitrification solutions In: Tucker MJ, Liebermann J, ed. *Vitrification in assisted reproduction*. 1st. ed. London. Informa Healthcare, 2007:45-63.
9. Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol*. 1993;158:101-112.
10. Alvarenga MA, Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM. Acrozoal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Equine Vet J*. 2000;32:541-545.
11. An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Takashi M. Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa. *Cryobiology*. 2000;40:237-249.
12. Andersen AN, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe. 2002. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2006;21:1680-1697.
13. Arav A, Heru D, Mattioli M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fertil*. 1993;99:353-358.
14. Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Andersen GB, Crowe JH. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology*. 1996;33:589-599.
15. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2002;187:77-81.
16. Aydinler F. Sperm kriyoprezervasyonu sonrasında apoptozun değerlendirilmesi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi*, 2008.
17. Babaei H, Derakhshanfar A, Kheradmand A. Vitrification of Mouse ovaries using ethylene glycol and DMSO as cryoprotectants: histopathological evaluation. *Veterinarski arhiv*. 2007;77:19-27.

18. Barnes FL, Damiani P, Looney CR, Duby RT. The meiotic stage affects subsequent development of cooled bovine oocytes. *Theriogenology*. 1997;47:183 (Abstract).
19. Benagiano G, Gianaroli L. The new Italian IVF legislation. *Reprod Biomed Online*. 2004;9:117-125.
20. Bianchi V, Coticchio G, Fava L, Flamigni C, Borini A. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Hum Reprod*. 2005;20:1078–1083.
21. Bianchi V, Coticchio G, Distratis V, Di Giusto N, Flamigni C, Borini A. Differential sucrose concentration during dehydration (0.2 mol/l) and rehydration (0.3 mol/l) increases the implantation rate of frozen human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2006;14:64–71.
22. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 2000;40:110–116.
23. Boisi I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, Barri P, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod*. 2002;17:1185–1891.
24. Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C, Coticchio G. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Hum Reprod*. 2006;21:512–517.
25. Bos-Mikich A, Wood MJ, Candy CJ, Whittingham DG. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 1995;53:780–785.
26. Bouquet M, Selva J, Auroux M. Effects of cooling and equilibration in DMSO, and cryopreservation of Mouse oocytes, on the rates of in vitro fertilization, development, and chromosomal abnormalities. *Mol Reprod Dev*. 1995;40:110–115.
27. Bucak MN, Tekin N. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*. 2007;54:67-72.
28. Cabria E, Anel L, Herraes MP. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*. 2001;52:623-635.
29. Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini DF. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol*. 2000;226:167–179.
30. Cha K, Koo J, Ko J, Choi D, Han S, Yoon T. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril*. 1991;55:109–113.

31. Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Wright G, Kort HI, Nagy ZP. Two successful pregnancies obtained following oocyte vitrification and embryo re-vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008;16:346-349.
32. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. 1986;1:884-886.
33. Chen SU, Lien YL, Chao KH, Lu HF, Ho HN, Yang YS. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil Steril*. 2000a;74:804-808.
34. Chen SU, Lien YL, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum Reprod*. 2000b;15:2598-2603.
35. Chen SU, Lien YL, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS), and grids. *Hum Reprod*. 2001;16: 2350-2356.
36. Chen SU, Lien YL, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing-a review article. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;202:101-107.
37. Chen SU, Lien YL, Chen HF, Tsai YY, Chang LJ, Yang YS. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum Reprod*. 2005;20:1975-1980.
38. Chen SU, Yang YS. Vitrification of oocytes: various procedures. In: Tucker MJ, Liebermann J, eds. *Vitrification in Human Assisted Reproduction*. New York: Informa Healthcare. 2007:129-144.
39. Chen SU, Yang YS. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *J Obstet Gynecol* 2009;48:15-22.
40. Chian, R. C., Kuwayama, M., Tan, L., Tan, J., Kato, O., Nagai, N. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *Journal of Reproduction and Development*. 2004a; 50: 685-696.
41. Chian RC, Buckett WM, Tan SL. In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2004b;8:148-166.
42. Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM, Tan SL. High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report (abstract). *Fertil Steril*. 2005;84(Suppl):36.
43. Cihangir N. İntrasitoplazmik spermenjeksiyonu-embriyo transferi sikluslarında otolog-kumulus hücre-oosit komplekslerinin kültür ortamı olarak kullanılmasının embriyo gelişim kalitesine, implantasyon ve gebelik oranlarına etkisinin araştırılması Konya, Selçuk Üniversitesi Uzmanlık tezi 2009.

44. Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A, Venturoli S. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril*. 2009;91:2399–2407.
45. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril*. 2008;89:1657–1664.
46. Coticchio G, Bonu MA, Sciajno R, Sereni E, Bianchi V, Borini A. Truths and myths of oocyte sensitivity to controlled rate freezing. *Reproductive Biomedicine Online*. 2007;15:24–30.
47. Cryologic vitrification method. [http://www.cryologic.com/CVM\\_FLYER.PDF](http://www.cryologic.com/CVM_FLYER.PDF). Son erişim tarihi 12 Nisan 2010.
48. Çetin Y. İmmatür siğır oositlerinin vitrifikasyon tekniği ile etilen glikol ve DMSO kullanarak payetlerde dondurulması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi; 2004.
49. Damien M, Luciano AA, Peluso JJ. Propanediol alters intracellular pH and developmental potential of mouse zygotes independently of volume change. *Hum Reprod*. 1990;5:212–216.
50. Delilbası L. İn Vitro Fertilizasyon Laboratuvar Yöntemleri, Birinci Basım, Günes Tıp Kitabevleri, Ankara, 2008;229–255.
51. Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum Reprod Update*. 2002;8:559–577.
52. Dewinter Software Inc. Dewinter Biowizard 4.3. [www.dewinterindia.com](http://www.dewinterindia.com). 2007.
53. Diez C, Duque P, Gomez E, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodriguez A, Fernandez L, La Varga S, Fernandez A, Facal N, Carbajo M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*. 2005;64:317–333.
54. Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High development rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization and somatic nuclear transfer. *Biol Reprod*. 2000;63:513–518.
55. Dozortsev D, Nagy P, Abdelmassih S, Oliveira F, Brasil A, Abdelmassih V, Diamond M, Abdelmassih R. The optimal time for intracytoplasmic sperm injection in the human is from 37 to 41 hours after administration of human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril*. 2004;82:1492–1496.
56. Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biol Reprod*. 2003;68:87–94.

57. Edwards RG, Brody SA. Oocyte growth, maturation, and fertilization. In: Edwards RG, Brody SA (ed), Principles and Practice of Assisted Human Reproduction. Philadelphia: WB Saunders, 1995:322-323.
58. Elbarbary T. Cryopreservation Par Vitrification Puis Transplantation Intra-uterine De Tissu Ovarien. Mısır, Geneve Üniversitesi. Doktora Tezi; 2004.
59. Eroglu A, Toth TL, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polypoidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril*. 1998;69:944-957.
60. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Venturoli S, Flamigni C. Oocyte cryopreservation. *Hum Reprod*. 1998;13:98-108.
61. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod*. 2001;16:411-416.
62. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984;21:407-426.
63. Farsani SK, Mahmoudi R, Abdolvahabi MA, Abbasi M, Malek F, Sobhani A. Comparing the viability and in vitro maturation of cumulus germinal vesicle break down (GVBD) oocyte complexes using two vitrification techniques in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2007;5:165-170.
64. Friedler S, Giudice IC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril*. 1988;49:743-764.
65. Fuku E, Liu J, Downey BR. In vitro viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. *Mol Reprod Dev*. 1995;40:177-185.
66. Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Crister JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod*. 1993;49:112-123.
67. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR*. 2000;41:87-196.
68. Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe M, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*. 2007;67:64-72.
69. George MA, Johnson MH. Use of fetal bovine serum substitutes for the protection of the mouse zona pellucida against hardening during cryoprotectant addition. *Human Reproduction*. 1993;8:1898-1900.
70. Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod*. 2005;20:3385-3389.
71. Ghetler Y, Skutelsky E, Nun I, Dor L, Amihai D, Shalgi R. Human oocyte cryopreservation and the fate of the cortical granules. *Fertil Steril*. 2006;86:210-215.
72. Gidoni Y, Holzer H, Tulandi T, Tan SL. Fertility preservation in patients with non-oncological conditions. *Reprod Biomed Online*. 2008;16:792-800.

73. Gook DA, Osborn SM, Johnson WI. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2 propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Human Reproduction*. 1993;8:1101-1109.
74. Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston WI. Fertilization of human oocytes following cryopreservation: normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Hum Reprod*. 1994;9:684-691.
75. Gook DA, Edgar DH. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod*. 2007;13:591-605.
76. Gosden RG, and Nagano M. Preservation of fertility in nature and ART. *Reproduction*. 2002;123:3-11.
77. Gougeon A, Echiochard R, Thalabard JC. Age related changes of population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early follicles in aging women, *Biol Reprod* 1994; 31: 50- 653.
78. Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod*. 2004;19:2884-2888.
79. Hochi S, Ito K, Hirabayashi M, Ueda M, Kimura K, Hanada A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. *Theriogenology*. 1998;49:787-796.
80. Hochi S, Hirabayashi M, Hirao M, Kato M, Kobayashi T, Kimura K, Hirasawa K, Leibo SP, Ueda M. Effects of cryopreservation of pronuclear-stage rabbit zygotes on the morphological survival, blasocyst formation, and full-term development after DNA micro-injection. *Mol Reprod Dev*. 2001;60:227-232.
81. Hoffman DI, Zellman GL, Fair CC, Mayer JF, Zeitz JG, Gibbons WE, Turner TG. Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research. *Fertil Steril*. 2003;79:1063-1069.
82. Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B, Cha KY. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril*. 1999;72:142-146.
83. Hredzak R, Ostro A, Maraaek I, Kaamarik J, Idilova V, Vesela J. Influence of slow-rate freezing and vitrification on mouse embryos. *Acta Vet Brno*. 2005;74:23-27.
84. Hurt AE, Landin F, Seidel GE, Squires EL. Vitrification of immature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose using open-pulled straws. *Theriogenology*. 2000;51:1303-1310.
85. Im KS, Kang JK, Kim HS. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. *Theriogenology*. 1997;47:881-891.

86. Imoedemhe DG, Sique AB. Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propandiol. *Journal of Assisted Reproduction & Genetics*. 1992;9:323–327.
87. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Dessole S, Nawroth F, Van de Ven H. Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril*. 2006;85:741–747.
88. Johnson MH, Pickering SJ. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development*. 1987;100:313–324.
89. Johnson MH. The effect on fertilization of exposure of mouse oocytes to dimethyl sulfoxide: an optimal protocol. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer*. 1989;6:168–175.
90. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. In: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B, ed. 8. Baskı, İstanbul, Barış Kitabevi, 1998.
91. Kalaycı Ş. Histoloji, Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1986.
92. Kan A, Kilani S, Tilia L, Mitchell F, Burns K, Chapman M. Pregnancy from intracytoplasmic injection of a frozen-thawed oocyte. *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2004;44:262–263.
93. Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci*. 1996;42:67–75.
94. Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril*. 2003;80:223–224.
95. Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*. 1998;37:325–338.
96. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 9. Baskı, Hacettepe-Taş 2000.
97. Kazem R, Thompson L, Srikantharajah A, Laing M, Hamilton M, Templeton A. Cryopreservation of human oocytes and fertilisation by two techniques: in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. 1995;10:2650–2654.
98. Keskintepe L. Vitrifikasyon için embriyo seçim kriterleri ve uygulaması. Uygulamalı kriyoprezervasyon ve güncel IVF teknikleri sempozyumu: sayfa 55,01 Kasım 2010, Ankara Midi Hotel.
99. Kim SH, Ku SY, Sung KC, Kang MJ, Kim SA, Kim HS, Oh SK, Jee BC, Suh CS, Choi YM, Kim JG, Moon SY. Simplified EM grid vitrification is a convenient and efficient method for Mouse mature oocyte cryopreservation. *Yonsei Medical Journal*. 2006;47:399–404.
100. Klemetti R, Sevon T, Gissler M, Hemminki E. Complications of IVF and ovulation induction. *Hum Reprod*. 2005;20:3293–3300.

101. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod.* 1999;14:3077–3079.
102. Kuwayama M, Kato O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2000;17:477.
103. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online.* 2005a;11:608-614.
104. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2005b;11:300-308.
105. Kuwayama M, Cobo A, Vajta G. Vitrification of oocytes: General considerations and the use of the Cryotop method. In: Tucker MJ, Liebermann J, ed. *Vitrification in assisted reproduction*. 1nd. ed. London. Informa Healthcare, 2007:119-128.
106. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel CryoLoop container-less technique. *Fertil Steril.* 1999;72:1073-1078.
107. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction.* 2006;131:53-61.
108. Le Gal F, Massip A. Cryopreservation of cattle oocytes: effect of meiotic stages, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology.* 1999;33:589–599.
109. Ledda S, Bogliolo L, Succu S, Ariu F, Bebbere D, Leoni GG, Naitana S. Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival. *Reprod Fertil Dev.* 2007;19:13-23.
110. Leeson TS, Leeson CR, Poparo AA. *Text/ Atlas Histology*. W.B Company. Harcourt Brace Jovanovich, 1988.
111. Leeuw FED, Leeuw AMD, Daas JHG, Colenbrander BV, Verkleij AJ. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology.* 1993;30:32-44.
112. Leibo SP, McGrath JJ, Cravalho EG. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology.* 1978;15:257-271.
113. Leibo S. Techniques for preservation of mammalian germplasm. *Anim Biotech.* 1992;3:139-153.
114. Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in-vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology.* 1993;39:81-94.
115. Leibo SP, Brandley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: C Gagnon (Ed), *The Male Gamet*. Cache River Press, St Louis. 1999; 502-515.

116. Levi Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A, Morreale G. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ ICSI cycles. *Human Reproduction*. 2006;21:370–375.
117. Liebermann J, Tucker MJ. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reprod*. 2002;124:483-489.
118. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker JM. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod*. 2002a;67:1671-1680.
119. Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Mathiopoulou H, Stillman RJ, Levy MJ. The importance of cooling rate for successful vitrification of human oocytes: comparison of the cryoloop with the flexipet. *Biol Reprod*. 2002b; 66(suppl 1):195 (abstract 240).
120. Lim JM, Fukui Y, Ono H. The post-thaw development capacity of frozen bovine oocytes following IVM and fertilization. *Theriogenology*. 1991;35:1225–1235.
121. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril*. 2006;85:108–111.
122. Luster SM. Cryopreservation of bovine and caprine oocytes by vitrification. BS University of Illinois, Urbana- Champaign, Yüksek Lisans Tezi, 2004.
123. Luyet BJ, Gehenio PM. Life and Death at Low Temperatures. *Biodynamica*, Normandy, MO. 1940.
124. Magistrini M, Szollosi D. Effects of cold and isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. *Eur J Cell Biol* 1980; 22:699–707.
125. Magnusson V, Feitosa WB, Goissis MD, Yamada C, Mara L, Tavares T, Ortiz ME, Assumpcao D, Visintin JA. Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. *Animal Reproduction Science*. 2008;106: 265-273.
126. Mahmoudi R, Ragardi KI, Abbasi M, Amidi F, Sobhani A, Abolhasani F, Saadipour KH, Amiri I. In vitro maturation and fertilization capacity of Mouse GV stage oocyte following stepwise vitrification. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2008; 259:230-345.
127. Mandelbaum J, Junca AM, Tibi C, Plachot M, Alnot MO, Rim H, Salat-Baroux J, Cohen J. Cryopreservation of immature and mature hamster and human oocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1988;541:550–561.
128. Mandelbaum J, Anastasiou O, Levy R, Guerin JF, De Larouziere V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes , *European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology*. 2004;113:17-23.
129. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod*. 1996;54:1059–1069.

130. Martins RD, Costa EP, Chagas JSC, Ignacio FS, Torres CAA, Mc Manus C. Effects of vitrification of immature bovine oocytes on in vitro maturation. *Animal Reprod.* 2005;2:128-134.
131. Massip A, Cryopreservation of embryos of farm animal. *Reprod Dom Anim.* 2001;36:49-55.
132. Matsumoto H, Shoji N, Sugawara S, Umezu M, Sato E. Microscopic analysis of enzyme activity, mitochondrial distribution and hydrogen peroxide in tow cell rat embryos. *J Reprod Fertil.* 1998;113:231-238.
133. Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology.* 2001;42:139-144.
134. Maturation and ovulation of the female gamete. [http ://www.academiavita.org/immagini/ Pubblicazioni/embrio/english/colombo](http://www.academiavita.org/immagini/Pubblicazioni/embrio/english/colombo). Son erişim tarihi 24 Eylül 2010.
135. Mavrides A, Morroll D. Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete?. *Reprod. Nutr. Dev.* 2002;42:73-80.
136. Mazur P. Equilibrium, quasi- equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics.* 1990;14:53-92.
137. Mazur P. Principles of cryobiology. In *Life in the Frozen State*. Fuller BJ, Lane N, Benson EE. ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 2004:3-65.
138. Mazur P, Seki S, Pinn IL, Kleinhans FW, Edashige K. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology.* 2005;51:29-53.
139. McGann LE, Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology.* 1999;15:382-390.
140. Men H, Monson RL, Rutledge JJ. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology.* 2002;55:1095-1103.
141. Menning BE. The emotional needs of infertile couples. *Fertil Steril.* 1980;34:313-319.
142. Menstrual Cycle: Pre & Post Ovulation. [http ://www. ovulation- calculator. Com/ menstrual-cycle. htm](http://www.ovulation-calculator.Com/menstrual-cycle.htm). Son erişim tarihi 30 Ekim 2010.
143. Morato R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology.* 2008;57:137-141.
144. Morris GJ, Watson PF. Cold-Shock injury - a comprehensive bibliography. *Cryo-Letters.* 1984;5:352-372.
145. Mullen S. Advances in the fundamental cryobiology of mammalian oocytes. University of Missouri-Columbia. Doktora Tezi, 2007.

146. Mullen S, Li M, Li Y, Chen ZJ, Critser J. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. *Fertil Steril*. 2008;89:1812–1825.
147. Nowshari MA, Nayudu PL, Hodges JK. Effect of cryoprotectant concentration, equilibration time and thawing procedure on survival and development of rapid frozen-thawed mature mouse oocytes. *Theriogenology*. 1994;42: 1193–1204.
148. Orief Y, Mosgau AS, Dafopoulos K, Al-Hasani S. Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation technique?. *Middle East Fertil Soc J*. 2005;10:171-184.
149. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Suzuki T. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology*. 1995;32:455–460.
150. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. In: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P, ed. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2009.
151. Özkavukçu S, Erdemli E. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*. 2002;24:187-196.
152. Palasz AT, Mapletopt RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv*. 1996;14:127-149.
153. Papis K, Shimizu M, Izaïke Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*. 2000;15:651–658.
154. Parks JE, Ruffing NA. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*. 1992;37:5973.
155. Parmegiani L, Cognigni G, Bernardi S, Ciampaglia W, Infante F, Pocognoli P, Tabarelli de Fatis C, Troilo E, Filicori M. Freezing within 2 h from oocyte retrieval increases the efficiency of human oocyte cryopreservation when using a slow freezing/rapid thawing protocol with high sucrose concentration. *Human Reproduction*. 2008;23:1771–1777.
156. Paynter SJ, Borini A, Bianchi V, De Santis L, Flamigni C, Coticchio G. Volume changes of mature human oocytes on exposure to cryoprotectant solutions used in slow cooling procedures. *Human Reproduction*. 2005;20:1194-1199.
157. Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocytes. *Hum Reprod*. 1987; 2:207-216.
158. Pickering S, Braude P, Johnson M. Cryoprotection of human oocyte: inappropriate exposure to DMSO reduces fertilization rates. *Hum Reprod*. 1991;6:142-143.
159. Pincus G. The eggs of mammals. Macmillan. New York. 1936.
160. Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949;164-166.

161. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;169:33-37.
162. Porcu E. Oocyte freezing. *Semin Reprod Med.* 2001;19:221-230.
163. Porcu E, Venturoli S, Damiano G, Ciotti PM, Notarangelo L, Paradisi R, Moscarini M, Ambrosini G. Healthy twins delivered after oocyte cryopreservation and bilateral ovariectomy for ovarian cancer. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:265-267.
164. Rama Raju GA, Haranath GB, Krishna KM, Prakash GJ, Madan K. Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod Biomed Online.* 2005;11:434-437.
165. Ren HS, Wei Y, Hua TC, Zhang J. Theoretical prediction of vitrification and devitrification tendencies for cryoprotective solutions. *Cryobiology.* 1994;31:47-56.
166. Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J, Greco E. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod.* 2004;19: 655-659.
167. Rojas C, Palomo MJ, Albarracín JL, Mogas T. Vitrification of immature in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubule, and actin microfilaments. *Cryobiology.* 2004;49:211-220.
168. Rudolph AS, Crowe JH. Membrane stabilization during: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology.* 1985;22:367-377.
169. Ruvalcaba L, Garcia M, Martinez R. Oocytes vitrification success: first ongoing Pregnancy in Mexico. *Reprod Hum.* 2005;3:7-10.
170. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*, 8. Edition, Lippincott Williams & Wilkins. 2000.
171. Sağırkaya H, Bağış H. Memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 2003;22:1-2-3:127-135.
172. Saki G, Dezfuly FG. Vitrification of Human Oocyte Using Cryoloop. *Iranian Journal of Reproductive Medicine.* 2005;3:19-24.
173. Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L. Morphology and fertilization of frozen human oocytes. *Gamete Res.* 1987;16:343-354.
174. Sathananthan AH. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: unique aspects of the human oocyte. *Microsc Res Tech.* 1994;27:145-164.
175. Saunders KM, JE Parks. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro matured bovine oocytes. *Biol Reprod.* 1999;61:178-187.
176. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology.* 2000;53:59-72.

177. Silber S. Infertility Center of St. Louis. 2006. [http://www.infertile.com/brochures/Treating\\_Infertility.pdf](http://www.infertile.com/brochures/Treating_Infertility.pdf). Son erişim tarihi 11 Kasım 2010.
178. Stachecki JJ, Munne S, Cohen J. Spindle organisation after cryopreservation of mouse, human and bovine oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*. 2004;8:664–672.
179. Sutton RL. Critical cooling rates to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *J Chem Soc Faraday trans*. 1991a;87:101-105.
180. Sutton RL. Critical cooling rates to avoid ice crystallization in aqueous cryoprotectant solutions containing polymers. *J Chem Soc Faraday trans*. 1991b; 87:3747-3751.
181. Toner M, Cravalho EG, Karel M, Armant DR. Cryomicroscopic analysis of intracellular ice formation during freezing of mouse oocytes without cryoadditives. *Cryobiology*. 1991;28:55-71.
182. Toth TL, Baka SG, Veeck LL, Jones HW, Muasher S, Lanzendorf, SE. Fertilization and in vitro development of cryopreserved human prophase I oocytes. *Fertility Sterility*. 1994;61:891-894.
183. Trounson AO, Kirby C. Problems in cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril*. 1989;52:778-786.
184. Trounson AO. Cryopreservation. *Br Med Bull*. 1990;46: 695-708.
185. Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL, Massey JB. Clinical application of human egg cryopreservation. *Human Reproduction*. 1998;13:3156–3159.
186. Uysal O. Sığır embriyolarının vitrifikasyonu. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*. 2007;78:45-50.
187. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 1998;51:53–58.
188. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*. 2000;62:357-364.
189. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006; 65:236-244.
190. Vajta G, Kuwayama M, Vanderzwalmen P. Disadvantages and benefits of vitrification. In: Tucker MJ, Liebermann J, ed. *Vitrification in assisted reproduction*. 1nd. ed. London. Informa Healthcare, 2007:33-44.
191. Valojerdi MR, Salehnia M. Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphase II (MII) mouse oocytes after slow freezing or vitrification. *J Assist Reprod Genet*. 2005;22:119–127.

192. Van Uem JF, Siebzehnruhl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes [letter] *Lancet*. 1987;1:752-753.
193. Vanderzwalm P, Bertin G, Debauche Ch, Standaart V, Schoysman E. "In vitro" survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Fertil Steril*. 2000;74:215-216.
194. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH, Quick SJ. Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte. *Mol Reprod Dev*. 1990a;26:227-235.
195. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH. The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1990b;89:253-259.
196. Wani NA, Maurya SN, Misra AK, Saxena VB, Lakhchaura BD. Effect of cryoprotectants and their concentration on in vitro development of vitrified-warmed immature oocytes in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 2004;61:831-842.
197. Watson PF, Morris GJ. Cold shock injury in animal cells. In Bowler K, Fuller BJ (eds). *Temperature and animal cells*. The Company of Biologist Limited, Cambridge. 1987;311-340.
198. Wetzels AMM. Cryopreservation /Theory. In Bras M, Lens JW. *Laboratory aspects of in vitro fertilization*. The Netherlands, N.V. Organon 1996; 229-244.
199. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*. 1972;178:411-414.
200. Whittingham DG. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized Mouse oocytes previously stored at -196°C. *J Reprod Fertil*. 1977;49:89-94.
201. Wood MJ, Barros C, Candy CJ, Carrol J, Melendez J, Whittingham DG. High rates of survival and fertilisation of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulphoxide. *Biology of Reproduction*. 1993;49:489-495.
202. Woods EJ, Gilmore JA, Liu J. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod*. 2000;15:335-343.
203. Wu B, Tong J, Leibo SP. Effects of cooling germinal vesicle-stage bovine oocytes on meiotic spindle formation following in vitro maturation. *Mol Reprod Dev*. 1999;54:388-395.
204. Yang D, Winslow KL, Nguyen K, Duffy D, Freeman M, Al-Shawaf T. Comparison of selected cryoprotective agents to stabilize meiotic spindles of human oocytes during cooling. *J Exp Clin Assist Reprod*. 2010;7:4.
205. Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*. 2007;67:81-89.

206. Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, Cha KY. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. Fertil Steril 2003;79:1323–1326.
207. Yuge M, Otoi T, Nii M, Murakami M, Karja NW, Rajaei F, Agung B, Wongsrikeao P, Murakami M, Suzuki T. Effects of cooling ovaries before oocyte aspiration on meiotic competence of porcine oocytes and of exposing in vitro matured oocytes to ambient temperature on in vitro fertilization and development of the oocytes. Cryobiology. 2003;47:102-108.

## 9. EKLER

### EK.A: Etik Kurul Onay Formu

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
**ETİK KURUL KARARLARI**

**Toplantı Sayısı: 02**

**Toplantı Tarihi: 27-02-2009**

**Karar Sayısı:2009/074;**Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Selçuk DUMAN'ın "**Kadın Gamet Hücresinde Optimal Vitrifikasyon Araştırması**" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 23.02.2009 tarihli dilekçesi ve ekleri görüldü; yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Selçuk DUMAN'ın sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verildi.

ASLI GIBİDİR  
27-02-2009

Sazer BİLGİN  
Fakülte Sekreteri

## **EK.B: Bilgilendirilmiş Onay Formu**

**Aşağıdaki konularda hastaya gerekli tüm bilgiler verilmelidir. Hazırlanacak olan HASTA ONAM FORMUNUZ ayrıntılı olarak aşağıdaki sıralamaya ve çalışmanızın niteliğine uygun bir şekilde hazırlanarak çalışma dosyanıza konulacaktır**

**a-** Araştırma, tüpbebek tedavisi için başvuru yapmış hastaların yumurta toplama günü elde edilen ve kullanılmayacak atık hedefli yumurtalarının ultra-hızlı dondurulmasına (vitrikasyonuna ) yönelik bir çalışmadır. Çalışmanın sonucunda yumurtaların ultra-hızlı dondurulması (Vitrifikasyonu) başarıyla sonuçlandırılırsa Tüpbebek hastaları ileriki dönemlerde bundan yarar sağlayacaktır. Çalışmada hastanın aleyhine işleyen herhangi bir durum olmadığı gibi bir risk unsuru da taşımamaktadır.

**b-** Yumurta dondurulması ile ilgili yavaş dondurma metodları şu anda kullanılmaktadır.

**c-** Araştırma süresi 12 aydır.

**d-** Artık yumurtalarla yapılacak olan çalışma, hastaya herhangi bir mali yük getirmeyecektir.

**e-** Hastanın kimlik bilgileri gizli tutulacaktır. Ancak elde edilen bulgular kullanılacaktır.

**f-** Araştırmada toplam 100 adet yumurta hücresi kullanılması planlanmıştır.

**g-** Çalışma süreci içinde herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun,  
adı-soyadı : Prof. Dr. Selçuk DUMAN tel. no : 05054075670

**h-** Hasta çalışmaya herhangi bir nedenle gönüllü olmadığı takdirde araştırmacı hastayı çalışma dışı bırakacaktır.

**i-** Gönüllü, çalışmanın herhangi bir zaman diliminde çalışmadan vazgeçme ve ayrılma hakkına sahiptir.

---

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

23/02/

2009

Gönüllünün Adı soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon/faks no.)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin adı soyadı, imzası (varsa telefon/faks no.)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı soyadı, İmzası:

Aslıhan ŞAYLAN

Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun Adı soyadı, İmzası (varsa telefon/faks no.)  
Doç. Dr. T. Murad AKTAN Tel. No: 05379609694

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin adı soyadı  
Ayten ŞAHİN (Hemşire)

## 10. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılı İzmir doğumludur. İlköğrenimini 1999 yılında İzmir Eşrefpaşa Tınaztepe İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra lise eğitimini 2002 yılında İzmir Eşrefpaşa Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında Konya Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun olduktan sonra 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD'da yüksek lisans eğitimine başladı.