

## 7 GÜNLÜK İN-VİTRO SIĞIR EMBRİYOLARININ VİTRİFİKASYONLA DONDURULMASI (The Vitrification of In Vitro Fertilized Bovine Embryos after 7 Days Cultured )

Sedat Hamdi KIZIL<sup>1</sup> Numan AKYOL<sup>1</sup> Tahir KARAŞAHİN<sup>1</sup> Muharrem SATILMIŞ<sup>1</sup>

1. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü – ANKARA

Geliř Tarihi : 15.03.2006

Kabul Tarihi : 01.10.2007

### ÖZET

Bu çalışmanın amacı, in vitro olarak üretilen siğir embriyolarının, vitrifikasyon metodu ile dondurulma başarısının incelenmesidir. Mezbahada kesilen ineklerin ovaryumlarından elde edilen oositlerden üretilmiş 100 adet iyi kalite in-vitro siğir embriyosu, kültürlerinin yedinci gününde vitrifikasyon metodu ile dondurulmuştur. Vitrifikasyon solüsyonları olarak, VS1 (0.1 M Sakkaroz + 0.1 M Ksiloz + %1 Polietilen Glikol + %10 Gliserol), VS2 (0.2 M Sakkaroz + 0.2 M Ksiloz + %2 Polietilen Glikol + %10 Gliserol + %10 Etilen Glikol) ve VS3 (0.3 M Sakkaroz + 0.3 M Ksiloz + %3 Polietilen Glikol + %20 Gliserol + %20 Etilen Glikol) kullanılmıştır. Vitrifikasyon solüsyonları ile muamele edilen embriyolar payetler içine yerleştirildikten sonra sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Çözündürmede, sıvı azot içerisinden çıkarılan payetler 5-6 saniye havada tutulmuş, 20<sup>0</sup>C'de suda tamamen çözündürülmüştür. Embriyolar kriyoprotektanların uzaklaştırılması (devitrifikasyon) işlemi için sırasıyla 0.5 M ve 0.25 M Sakkaroz solüsyonları içerisine alınmıştır. Sonra embriyolar morfolojik değerlendirme için %20 buzağı serumlu Dulbecco'nun Fosfat Tampon Solüsyonu (D-PBS) içerisine alınmıştır. Kültür medyumunu olarak TCM-199 + 0,1mM β-Merkaptoetanol + %20 Fötal Buzağı Serumunu (FCS) kullanılmıştır. İn vitro canlılık kontrolü amacıyla embriyolar, %5 CO<sub>2</sub>, %99 bağıl nem ve 38,5<sup>0</sup>C'deki inkubatörde 24-48 saat inkubasyona tabi tutulmuştur. Çözündürme sonrası PBS'e alınan 100 adet embriyonun, 85'inin intakt olduğu görülmüştür. Blastosistlerin re-ekspansiyon ve zonadan çıkma oranı %35 bulunmuştur. Buna göre in vitro üretilerek vitrifiye edilen siğir embriyolarında %35 canlılık tespit edilmiştir. İn vitro üretilen embriyolar vitrifikasyon metodu kullanılarak kolaylıkla dondurulmuş ve tatminkar düzeyde canlılık sağlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler :** Embriyo, siğir, vitrifikasyon, kriyoprotektan

### SUMMARY

The aim of the study was to investigate the effect of vitrification on in vitro produced bovine embryos. For this purpose, oocytes were provided from ovaries of slaughtered cows and 7 days after start of embryo culture 100 good quality in vitro produced bovine embryos were frozen by vitrification method. Vitrification solutions were composed as VS1 (0.1 M Sucrose + 0.1 M Xylose + 1% Poly Ethylene Glycol + 10% Glycerol), VS2 (0.2 M Sucrose + 0.2 M Xylose + 2% Poly Ethylene Glycol + 10% Glycerol + 10% Ethylene Glycol) and VS3 (0.3 M Sucrose + 0.3 M Xylose + 3% Poly Ethylene Glycol + 20% Glycerol + 20% Ethylene Glycol). The processed embryos with vitrification solutions were frozen in liquid nitrogen after placed into straws. The straws were thawed by holding in air for 5-6 sec and in 20<sup>0</sup>C water. Embryos were transferred 0.5 M and 0.25 M sucrose solutions for devitrification procedure respectively. Then, the embryos were transferred into D-PBS (with 20% calf serum) for morfolological evaluation. TCM-199 + 0.1mM β-Mercaptoethanol + 20% Foetal Calf Serum (FCS) composition was used as culture media. For in vitro survival control, embryos were incubated in the conditions with regard to 5% CO<sub>2</sub>, at 38.5<sup>0</sup>C and 99% humidity for 24-48 hours. 85 intacted embryos were obtained from 100 embryos after thawing in Phosphate Buffer Solution. The re-expansion and hatching rate of blastocysts were 35%. So, in vitro produced and vitrified bovine embryos survived with rate of 35%. As a result, in vitro produced embryos were frozen easily by vitrification method and provided satisfactory level for survival.

**Key words :** Embryo, bovine, vitrification, cryoprotectant

### GİRİŞ

Memeli embriyolarının dondurularak muhafazası çalışmalarına ilk olarak 1972 yılında Whittingham, Leibo ve Mazur tarafından başlanmıştır (25). Vitrifikasyon olarak isimlendirilen oldukça hızlı bir dondurma metodunu, 1985 yılında Rall ve Fahy bulmuş-

lar ve evcil hayvan embriyo teknolojisinde bu metot yaygın bir şekilde uygulanmıştır (5, 6, 9). Vitrifikasyonda embriyolar yüksek konsantrasyonlu solüsyonlar ile muamele edilir. Bu metot, viskozitesi hızla artan solüsyonlar içerisinde buzların kristalize

olmadan cam benzeri katılaşması olarak tanımlanır (6, 11, 13, 17, 18).

Değişik canlılarda ve değişik gelişim safhalarındaki embriyoların vitrifikasyonla dondurularak muhafazası çalışmasında, Etilen Glikol (EG), Fikol ve Sakkaroz dan oluşan bir karışımın etkili olduğu tespit edilmiştir (11). Memeli embriyolarının vitrifikasyonunda, %40'lık EG içeren Fikol 70'in, Poli Etilen Glikol (PEG)'den daha az toksik olduğu tespit edilmiştir (12). Kimyasalların zararlı etkilerini azaltmak için, kriyoprotektanlarla muamele zamanı kısaltılmalı, düşük toksisiteli kriyoprotektanlar kullanılmalı ve kriyoprotektan yoğunluğu azaltılmalıdır (21). Memeli embriyolarının dondurulması için, permeabl olan komponentlerden, Gliserol (GL), Dimetil-sülfoksit (DMSO), Propilen Glikol (PG)(1,2-propandiol), EG, Asetamid, permeabl olmayanlardan, Galaktoz, Sakkaroz, Trehaloz gibi sakkaritler ve makromoleküllerden, PEG, Poli-vinilpirolidon (PVP), Sığır Serum Albumini (BSA) ve Fikol 70 kullanılmaktadır (13).

Fare embriyolarında kriyoprotektanlarla yapılan toksisite testinde, EG'nin en az toksik olduğu, bunu sırasıyla GL, DMSO, PG'nin izlediği ve Asetamid'in ise en toksik olduğu bulunmuştur. Vitrifikasyon solüsyonunda sakkaroz'un bulunmasının toksik etkiyi azalttığı tespit edilmiştir (9).

Çözündürme sonrası embriyonun yaşama kabiliyetinin, embriyonun kalitesine, gelişim safhasına ve türe bağlı olduğu görülmüştür (5, 7). Son araştırmalar göstermektedir ki, dondurularak muhafaza edilen in vitro embriyolarda yüksek canlılık oranı elde etmek için kriyopreservasyon metotlarından daha çok maturasyon ve kültür tekniklerinin geliştirilmesi çalışmalarına başlanılmalıdır (15).

Farklı bir vitrifikasyon solüsyonu olan EFS 40'ın ( EG, Fikol, Sakkaroz ) denendiği bir araştırmada, dondurulan sığır embriyolarında çözündürme sonrasında canlılık oranı

%72 bulunmuştur (11). PEG, BSA, PVP, Fikol'ün %6'lık solüsyonları ile muamele sonrasında dondurulan embriyoların canlılık oranları sırasıyla, %79.3, %34.8, %41.4 ve %57.1 olarak tespit edilmiştir (20).

%10 GL, 2.1 mol/litre GL + 0.25 mol/litre Sakkaroz (5 dakika ön dondurmalı) ve % 25 GL+% 25 EG (5 dakika ön dondurmalı) vitrifikasyon metotlarında blastosistlerdeki canlılık oranları sırasıyla, %68.0, %59.0 ve %65.7 bulunmuş, metotlar arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir (27).

EFS, modifiye EFS (mEFS) ve EG + GL gibi üç farklı vitrifikasyon solüsyonunda zonadan çıkma oranları, mEFS ve EG + GL vitrifikasyon solüsyonlarında, EFS den daha yüksek bulunmuştur (%57.7, %59.6, %35.7; P<0.05) (17).

Fare embriyolarının vitrifikasyon ile tekrarlanan dondurma/çözündürme çalışmasında, 1. uygulamada zonadaki hasar %1.2 ve embriyoların gelişim oranı %91 iken 10. uygulama sonrası zona hasarı %75 bulunmuş ve embriyo gelişiminin aynı oranda düştüğü tespit edilmiştir (10).

144 ovaryumdan toplanan toplam 450 olgunlaşmamış sığır oositinden elde edilen 126 blastosistin re-ekspansiyon oranı %69.2 (81 blastosist) bulunmuş ve bunlarında %39.5'u (32 blastosist) zonadan çıkmıştır. 7. ve 8 – 9. günlerde vitrifiye edilen blastosistler arasında re-ekspansiyon ve zonadan çıkma oranları (%74.6 ve %46, %62 ve %29) olacak şekilde farklı bulunmuştur. Taşıyıcı ineklere yapılan 18 embriyo naklinden 3 buzağı doğmuştur (%16.7) (14).

VS3a (VS3a: 6,5 M GL ve %6 w/v BSA PBS içinde) ile vitrifiye edilen 116 embriyonun, çözündürme sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlılık oranları sırasıyla, %11, %0 ve %0 olarak tespit edilmiş, zonadan çıkan blastosist elde edilememiştir (4).

1273 siğir embriyosu 1,6 M PG, 1,8 M EG, 1,4 M GL kullanılarak geleneksel yöntemle dondurulmuştur. Gebelik oranları sırasıyla, %36, %44.7, %48.6 ve %46.0 olarak bulunmuştur (3).

Vitrifiye embriyolarda %23 ve geleneksel yavaş dondurmada %14 gebelik oranı elde edilmiştir. İn vitro üretilen, vitrifikasyon ve geleneksel yöntemlerle dondurularak muhafaza edilen embriyolarda gebelik oranı, taze embriyo nakline göre düşüktür (26).

Bu çalışma, 7 günlük in vitro siğir embriyolarının vitrifikasyonla dondurulmasının etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır.

## **MATERYAL ve METOT**

### **MATERYAL**

Materyal olarak Çubuk mezbahasından alınan siğir ovaryumlarından elde edilen oositler kullanılmıştır.

### **METOT**

Ovaryumlar, 25-30°C'deki, %0,9'luk NaCl solüsyonu içerisinde alınarak en geç 2-3 saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Oosit kumulus kompleksleri 18-G'luk iğne ile 2-6 mm çaplı follüküllerden aspire edilmiştir. Aspirasyon sonrası elde edilen oositler 100 µl'lik TCM-199 mikrodamları içerisinde 20-22 saat maturasyona tabi tutulmuş, Bracket Oliphant (BO) mikrodamları içerisinde 5-6 saat fertilizasyon sonrası, 100 µl'lik Charles Rosenkrans 1 amino asit (CR1aa) mikrodamları içerisinde yedi gün kültüre edilmiştir. Elde edilen in vitro fertilize (IVF) embriyolar sınıflandırmaya tabi tutulmuş ve dondurmaya uygun olanlar vitrifikasyon metodu ile dondurulmuştur.

Çözündürmede, sıvı azot içerisinde çıkarılan ve içerisinde dondurulmuş in vitro üretilen (IVP) embriyoların bulunduğu payet 5-6 sn. havada tutulduktan sonra 20°C'lik

ılık su içerisinde yaklaşık 10-15 sn. bekletilerek sakkarozun tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Kesilen payet içerisindeki embriyolar stereo mikroskop altında bulunmuş ve hemen 0.5 M sakkaroz solüsyonu içerisine alınarak kriyoprotektanların uzaklaştırılması (devitrifikasyon) işlemi başlatılmıştır. Buradan 0.25 M sakkaroz solüsyonu içerisine aktarılan embriyolar, enson %20 Buzağı serumlu (CS) Dulbecco'nun Fosfat Tampon Solüsyonu (D-PBS) içerisine alınmıştır. Embriyolar canlılıklarının kontrol edilmesi amacıyla TCM-199 + 0,1 mM β-Merkaptoetanol + %20 Föetal Buzağı Serum'u (FCS) içeren solüsyon içerisine alınmış ve %99 bağıl nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 38,5°C'li inkubatörde, 24-48 saat inkubasyona tabi tutulmuştur. Re-ekspansiyon olan ve zonadan çıkan IVP embriyolar canlı olarak değerlendirilmiştir.

Dondurulan/çözündürülen embriyoların %20 CS'li D-PBS de intakt oranları, kültür medyumunda ise re-ekspansiyon ve zonadan çıkmış olanların canlılık oranları tespit edilmiştir.

### **BULGULAR**

Yedi günlük IVP embriyolardan; mükemmel ve iyi kalitede 61 adet genişlemiş blastosist ve 39 adet blastosist olmak üzere toplam 100 adet vitrifiye edilmiştir. Çözündürme sonrası, %20 CS'li D-PBS solüsyonu içerisine alınan embriyoların 85 adetinin intakt olduğu görülmüş ve intakt embriyo oranı %85 olarak tespit edilmiştir.

TCM-199 + 0,1 mM β-Merkaptoetanol + %20 FCS içeren kültür solüsyonu içerisindeki embriyolarda, re-ekspansiyon ve zonadan çıkma oranı %35 olarak bulunmuştur.

### **TARTIŞMA ve SONUÇ**

IVP embriyolar için elde edilen re ekspansiyon ve zonadan çıkma oranı, Martinez ve ark. (17)'nin, EFS sonuçlarına benzer

bulunmuş olması, vitrifikasyon için kullanılan kriyoprotektanların sığır embriyoları için uygun olduğunun göstergesidir.

Enright ve ark. (4), Rizos ve ark.'nın (22) SOF kültür solüsyonu, Cseh ve ark.'nın (2) Rall Vitrifikasyon Medyumunda (RVM) vitrifiye edilen erken ve genişlemiş blastosistler ile Massip Vitrifikasyon Medyumunda (MVM) vitrifiye edilen genişlemiş blastosistlerden ve Nguyen ve ark.'nın (19) 1. gün sonuçlarından yüksek bulunmuş olması, çözündürme sonrası canlılık konusunda başarı elde edildiğini ve laboratuvar şartlarının bunun için yeterli olduğunu ifade etmektedir.

Nguyen ve ark.'nın (19) 2. ve 3. gün bulguları ile Leibo ve ark. (15), Cho ve ark. (1), Lazar ve ark. (14), Kaidi ve ark. (8), Cseh ve ark.'nın (2) MVM'de vitrifiye edilen erken blastosistlerden ve Rizos ve ark.'nın (22) TCM-199 Granuloza Hücre Medyumu (GCM) sonuçlarından düşük bulunması ise, in vitro embriyoların dondurmaya ve ani ısı değişimlerine daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Yapılan araştırmalar göstermektedir ki, in vitro sığır embriyolarının dondurularak muhafazasında vitrifikasyon tekniğinin etkisi, geleneksel dondurma yöntemine göre daha fazladır. Bu teknik; kolay ve kısa sürede uygulanabilmesi, maliyetinin az olması ve embriyo dondurulması amacıyla kullanılan pahalı cihazlara gereksinim duyulmaması gibi avantajları da göz önüne alındığında, ülkemizde sığır embriyolarının dondurularak muhafazasında kolaylıkla kullanılabilir.

Vitrifikasyon sonrasında kültür koşulları in vitro fertilize embriyoların canlılığı ve kalitesini etkilemektedir. Dondurularak muhafaza edilen in vitro embriyolarda yüksek canlılık oranı elde etmek için kriyopreservasyon metodlarından daha çok, çözündürme sonrası embriyoların bulundurulacağı kültür ortamlarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Vitrifikasyonla dondurularak çözüldürülen embriyoların uygun sayıda taşıyıcı hayvana nakledilmesi ve bu tekniğin in vivo embriyolarda da uygulanarak daha yüksek gebelik oranlarının elde edilmesi araştırmanın nihai hedefine zenginlik katacaktır.

Sonuç olarak, in vitro üretilen 7 günlük sığır embriyolarının, çözündürme sonrası tatminkar düzeyde canlılık elde edildiği için vitrifikasyonla dondurulabileceği kanaatine varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Cho SK, Cho SG, Bae IH, Park CS, Kong IK (2002) *Improvement in post-thaw of in vitro produced bovine vitrified by glass micropipette (GMP)*. Animal Reproduction Science, 73:151-158.
2. Cseh S, Horlacher W, Brem G, Corselli J, Seregi J, Solti L and Bailey L (1999) *Vitrification of Mouse embryos in two cryoprotectant solutions*. Theriogenology, 52:103-113.
3. Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshida N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S (1998) *Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program*. Theriogenology, 49 (5) 1051-1058.
4. Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP (2000) *Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: Implantations for early embryo development and quality*. Theriogenology, 54: 659-673.
5. Fahning ML and Garcia MA (1992) *Status of cryopreservation of embryos from domestic animals*. Cryobiology, 29 (1) 1-18.
6. Gábor V (2000) *Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals*. Animal Reproduction Science, 60-61 (2) 357-364.
7. Kaidi S, Donnay I, Van Langendonck A, Dessy F and Massip A (1998) *Comparison of two co-culture systems to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification*. Animal Reproduction Science, 52 (1) 39-50.
8. Kaidi S, Donnay I, Lambert P, Dessy F and Massip A (2000) *Osmotic behavior of in vitro produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival*. Cryobiology, 41:106-115.

9. **Kasai M** (1996) *Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos*. *Animal Reproduction Science*, 42: 67-75.
10. **Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T and Edashige K** (1996) *Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming*. *Cryobiology*, 33: 459-464.
11. **Kasai M** (1997) *Cryopreservation of mammalian embryos*. *Molecular Biotechnology*, 7 (2) 173-179.
12. **Kasai M** (1998) *Principles of the cryopreservation of mammalian embryos by vitrification*. *Reproductive Biology* 415 - 424.
13. **Kasai M** (2000) *Cryopreservation of mammalian embryos*. Textbook, 1-39.
14. **Lazar L, Spak J and Dávid V** (2000) *The Vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method*. *Theriogenology*, 54: 571-578.
15. **Leibo SP and Loskutoff NM** (1993) *Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos*. *Theriogenology*, 39 (1) 81-94.
16. **Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW** (1996) *Stage-dependent sensitivity of oocyte and embryos to low temperatures*. *Animal Production Science*, 42: 45-53.
17. **Martinez AG, de Matos DG, Furnus C C and Brogliatti GM** (1998) *In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos*. *Theriogenology*, 50 (5) 757-767.
18. **Martínez AG, Valcárcel A, de las Heras MA, de Matos DG, Furnus C and Brogliatti G** (2002) *Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations*. *Animal Reproduction Science*, 73 (1-2) 11-21.
19. **Nguyen BX, Sotomaru Y, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y** (2000) *Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification*. *Theriogenology*, 53:1439-1448.
20. **Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomogane H** (1997) *Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro-derived bovine blastocysts*. *Animal Reproduction Science*, 48 (1) 27-36.
21. **Ohboshi S** (1998) *Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification*. *Animal Science Technology*, 69 (12) 1069-1077.
22. **Rizos D, Ward F, Boland MP and Lonergan P** (2001) *Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification*. *Theriogenology*, 56:1-16.
23. **Saito N, Imai K, Tomizawa M** (1994) *Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro*. *Theriogenology*, 41 (5) 1053-1060.
24. **Van Soom A, Mijten P, Van Vlaenderen I, Van den Branden J, Mahmoudzadeh AR, and De Kruif A** (1994) *Birth of double-muscled Belgian Blue calves after transfer of in vitro produced embryos into dairy cattle*. *Theriogenology*, 41: 855-867.
25. **Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P** (1972) *Survival of Mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$* . *Science*, 178: 411-414.
26. **Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF and Kruip THAM** (1994) *Developmental potential of in vitro produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer*. *Theriogenology*, 42 (8) 1275-1284.
27. **Xu ZhaoXue, Lan YaLi, An SenYa, Du ShaoFu, Xin Xiao Ling, Wei ChengBin, Qian JuFen, Xu ZX, Lan YL, Du SF, Xin XL, Wei CB, Qian JF** (1997) *Studies on the cryopreservation of IVF bovine embryos*. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 17 (4) 402-405.