

Vitrifikasyon Yöntemiyle Dondurulan İn Vitro Üretilmiş Sığır Embriyolarının Payet İçinde Devitrifikasyonunun Embriyo Canlılığı Üzerine Etkisinin Araştırılması*

Muharrem SATILMIŞ¹ Numan AKYOL² Sedat Hamdi KIZIL¹
Mustafa Numan BUCAK³ Tahir KARAŞAHİN⁴

¹Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara

²Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kırıkkale

³Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Konya

⁴Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Aksaray

satilmis96@gmail.com

Özet

Bu çalışmanın amacı, vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan in vitro koşullarda üretilmiş sığır embriyolarında direkt transfer tekniğine uygun olarak payet içerisinde gerçekleştirilen devitrifikasyonun embriyo canlılığı üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Çalışmada, mezbahadan sağlanan ovaryumlardan toplanan oositler kullanılarak in vitro üretilen 84 adet iyi kalite embriyo kullanılmıştır. Embriyolar kültürlerinin yedinci günü vitrifikasyon tekniği ile dondurulmuş ve çözödürülen embriyoların devitrifikasyon işlemi payet içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için, çözödürülen payetleri sallayarak içerisindeki vitrifikasyon ve devitrifikasyon solüsyonlarının karışması sağlanmıştır. Vitrifiye edilen embriyolardan kontrol grubundakiler payetten dışarı alınarak devitrifiye edilmiştir. Deneme gruplarında ise çözödürülen payetler oda sıcaklığında üç farklı süreyle (G1=5, G2=15 ve G3=20 dk.) bekletilerek devitrifiye işleminin payet içerisinde gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. Devitrifikasyon sonrası bütün gruplarda embriyolar TCM-199 mediumu içerisinde kültüre alınarak kültürün 24 ve 48. saatlerinde embriyo canlılık oranları incelenmiştir. İntaktooplazmalı embriyo oranları yönünden çözödürme sonrası kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel fark görülmemiştir. 24 ve 48. saat canlılık oranları bakımından gruplar arası farklılıklar önemli bulunmuş ve deneme gruplarında kontrol grubuna göre daha düşük embriyo canlılık oranı elde edilmiştir (P<0.05). Bu çalışma ile payete yerleştirilen vitrifikasyon ve devitrifikasyon solüsyonları arasında hava boşluğu bırakılmasının devitrifikasyon işleminin beklenen düzeyde gerçekleşmesine imkan vermediği dolayısıyla payet içerisinde yerleştirilen embriyo, vitrifikasyon ve devitrifikasyon solüsyonlarının yerleşim şekliyle ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Invitroembriyo, vitrifikasyon, devitrifikasyon, direkt transfer

Investigation of The Effects of in Straw Devitrification of In Vitro Produced Bovine Embryos Frozen by Vitrification on Embryo Viability

Abstract

The aim of this study was to investigate embryo viability rates after devitrification in straw to use of these embryos for direct transfer technique in frozen bovine embryos by vitrification method. In the study, oocytes were provided from ovaries of slaughtered cows and a total of 84 embryos with good quality were produced in vitro. Embryos were frozen by vitrification method at 7th day of their culture and, devitrification process of thawed embryos were carried out in straws. For this purpose, thawed straws containing vitrification and devitrification solutions were mixed up by shaking. Control group of vitrified embryos were taken out of the straws for devitrification. In experimental groups, straws were devitrified at room temperature for three different time periods (G1 = 5, G2= 15 and G3 = 20 min.) After devitrification, embryos of all groups were cultured into TCM-199 medium and survivability controls of embryos were performed at 24 and 48 hours. There was no statistically significant difference among control and other groups regarding rates of embryo with intact ooplasm. Significant differences were obtained between the groups in point of embryo viability rates at 24 and 48 hours of culture environment, and viability rate of embryos were lower in experimental groups than those of controls (p<0.05). In conclusion, the air gap spacing between vitrification and devitrification solutions seemed to disable devitrification process, and hence further studies will be needed to assign the location of embryos, vitrification and devitrification solutions in straws for better devitrification process.

Key Words: In vitro embryo, vitrification, devitrification, direct transfer

Giriş

Günümüzde, kullanılan kriyoprotektanlar ve uygulanan soğutma hızına bağlı olarak farklı embriyo dondurma yöntemleri kullanılmaktadır. Vitrifikasyon metodu bu yöntemlerden biri olup, diğer klasik dondurma yöntemlerine kıyasla daha ekonomik ve pratik, embriyo dondurma süresinin kısa ve donma esnasında buz kristali oluşumunun düşük düzeyde olması nedeniyle tercih edilmektedir. Vitrifikasyon yüksek oranda yoğunlaştırılmış kriyoprotektan solüsyonunun buz kristalleri oluşturmaksızın soğutma esnasında katılaşmasıyla (camlaşma) uygulanan fiziksel işlem olarak tanımlanmaktadır. Bu katılaşan ortam, sıvı halin moleküler ve iyonik dağılımını engeller (Ataman 1998).

Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan embriyolarda hücre içi buz kristalleri oluşmadığı ve bundan dolayı hücrelerin büyük oranda zarar görmediği kabul edilir (Kasai, 1997). Geliştirilen vitrifikasyon metotlarının pek çoğunda kriyoprotektanların birkaç adımda embriyodan uzaklaştırılması gerekir (Massip ve ark., 1987, Ishimori ve ark., 1993). Bu durum vitrifikasyon metodunun çiftlik koşullarında kullanımını güçleştirmektedir. Embriyoların dondurulması için kullanılan geleneksel yöntemlerde pahalı cihazlara gereksinim duyulmaktadır. Dondurma yöntemlerindeki temel prensip, donma ve çözünme sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek, hücrelerin buz kristallerinden görece zararı önlemektir (Sağırkaya ve Bağış 2003).

Kriyoprotektan maddelerin suyla oluşturulan solüsyonlarının camsı faz oluşturabilme özellikleri değişkendir. Bu durumun, her bir kriyoprotektanın donmaya olan eğilimi ve su molekülleri ile olan etkileşimlerindeki farklılıktan kaynaklandığı bildirilmiştir (Palasz ve Mapletoft, 1996). Blastosist safhasındaki sığır embriyolarının dondurulmasında etilen glikol ve gliserolünpropilen glikolden daha düşük toksisiteye sahip olduğu bildirilmektedir (Tachikawa ve ark., 1993). Dondurma solüsyonlarında olduğu gibi vitrifikasyon solüsyonlarına sakkaroz ilave edildiğinde embriyo üzerine toksik etkinin azaldığı görülmüştür (Vicenta ve Garcia-Ximenez, 1996).

Devitrifikasyon işlemi için laboratuvar ortamına ihtiyaç duyulması vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan embriyoların saha şartlarında pratik olarak kullanımını zorlaştırmaktadır. Vitrikiye edilmiş embriyoların taşıyıcı hayvanlara direkt transferinin mümkün olmasının, embriyo transferi maliyetini azaltacağı ve işgücü açısından katkı sağlayacağı varsayılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan in vitro koşullarda üretilmiş sığır embriyolarında direkt transfer tekniğine uygun olarak payet içerisinde gerçekleştirilen devitrifikasyonunun embriyo canlılığı üzerine etkisinin araştırılması olmuştur.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, in vitro üretilmiş 84 adet sığır embriyosu kullanılmıştır. Embriyolar vitrifikasyon tekniği ile dondurulduktan sonra biri kontrol grubu (GK) olmak üzere toplam dört farklı gruba ayrılmıştır (GI, GII, GIII). Kontrol grubundaki embriyolar çözündürme sonrası sakkaroz solüsyonu ile devitrifiye edildikten sonra kültür ortamına alınmıştır. Deneme gruplarındakilerde, devitrifikasyon işlemi payete yerleştirilen sakkaroz solüsyonu ile yapılmış ve ardından kültür ortamına alınmıştır.

In vitro Embriyo Üretimi

Çalışmada kullanılan embriyoların elde edilmesi amacıyla, çevre mezbahalarda kesilen hayvanların ovaryumlarının aspirasyonundan sağlanan oositler kullanılmıştır.

TCM-199 mediumun damature edilen oositler Bracket-oliphant (BO) mediumunda 5-6 saat fertilizasyona tabi tutulduktan sonra (Kanagawa ve ark., 1995) CR1aa mediumu içerisinde kültüre alınmıştır (%5 CO₂, %98 nem ve 38.5 °C). Bütün gruplarda, kültür sonrası yedinci gün iyi kaliteli blastosist safhasındaki embriyolar kullanılmıştır (Wright 1998).

Embriyoların Vitrifikasyonu

Kontrol grubu ve deneme gruplarındaki embriyoların tamamı vitrifikasyon metoduyla dondurulmuştur (Saito ve ark. 1994). Vitrifikasyon amacıyla Tablo 1'de gösterilen üç ayrı solüsyon kullanılmıştır.

Tablo1. Vitrifikasyon solüsyonlarının bileşimi

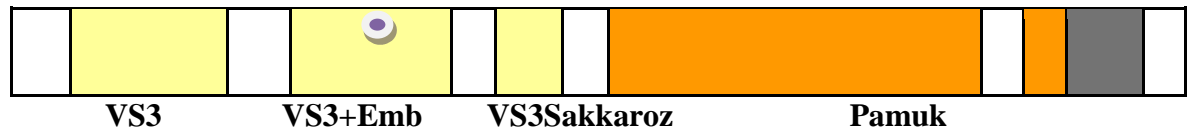
	Gliserol (%)	Etilen Glikol (%)	Sakkaroz (M)	Ksiloz (M)	*BSA (%)
VS (1)	10	-	0.1	0.1	1
VS (2)	10	10	0.2	0.2	2
VS (3)	10	30	0.3	0.3	3

*BSA: Sığır serum albumini

Oda sıcaklığında; embriyolar sırasıyla VS1 (5 dk), VS2 (2 dk) ve VS3 (1 dk) şeklinde ekilibrasyonun ardından (Şekil 1) 0.25ml hacmindeki payetlere alınmıştır (Şekil 2). Deneme gruplarında (GI, GII ve GIII) devitrifikasyonun payet içerisinde gerçekleştirilmesi için 0.5M sakkaroz kullanılmıştır. Payetlerin ağzı ısı ile kapatıldıktan sonra sıvı azota bırakılarak dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Embriyoların VS3'e maruz kalma süresinin en fazla 1 dk olmasına özen gösterilmiştir.



Şekil 1. Embriyoların VS1, VS2 ve VS3 içerisindeki durumları



Şekil 2. VS*, sakkaroz solüsyonları ve embriyonun payet içerisindeki durumu

*: Vitrifikasyon solüsyonu

Embriyoların Çözdürülmesi ve Kültürü

Dondurulan bütün embriyo payetleri sıvı azottan çıkarılarak 5-6 saniye havada bekletildikten sonra 20°C su içerisinde 10 saniye süreyle çözdürülmüştür. Kontrol grubundaki embriyolar, çözdürme sonrası payet dışına alınarak 0.5M (5 dk) ve 0.25M (5 dk) sakkaroz solüsyonlarıyla muamele edilmiş ve kriyoprotektanlar uzaklaştırıldıktan sonra TCM-199 içerisinde kültüre alınmıştır.

Deneme grubundaki embriyolar, çözdürme sonrası kontrol grubundan farklı olarak sakkaroz solüsyonu ile muamele edilmemiştir. Deneme gruplarındaki embriyoların tamamı

payet, pamuk tıkaç kısmından elle tutularak hızlı bir şekilde sallanarak, embriyonun bulunduğu VS3 solüsyonu ile sakaroz solüsyonunun payet içerisinde karışması ve böylece, devitrifikasyon işleminin payet içerisinde gerçekleştirilmesine çalışılmıştır. Daha sonra payetler oda sıcaklığında GI, GII ve GIII gruplarında sırasıyla 5, 15 ve 20 dk bekletildikten sonra embriyolar TCM-199 içerisinde kültüre alınmıştır.

Kültür ortamına alınan embriyoların 24 ve 48. saat gelişim durumları kaydedilerek, kontrol grubu ile deneme grubu ve ayrıca deneme gruplarının kendi aralarında farklılık olup olmadığı karşılaştırılmıştır. Farklılıkların istatistiki olarak karşılaştırılmasında Khi-kare ve G testi kullanılmıştır.

Bulgular

Embriyoların kültüre alındığı andaki yapılan değerlendirmede, intakt embriyo oranları (Çözdürme sonu re-ekspand embriyo oranı) (%) yönünden kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Çözdürme sonu kültürdeki 24 ve 48. saatlerde canlılık oranları bakımından gruplar arası farklılıklar önemli bulunmuştur ($P<0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Vitriyfe embriyoların çözüm sonrası bulguları

Gruplar	Vitriyfe embriyo (n)	Çözdürme sonu re ekspand embriyo (%)	24. saat canlılık (%)	48. saat hatching (%)
Kontrol	20	80	65 ^a	30 ^a
I.	21	67	43 ^a	5 ^b
II.	21	57	10 ^b	0 ^b
III.	22	50	5 ^b	0 ^b

^{a,b} Aynı sütunda farklı harf taşıyan oranlar arası farklılıklar önemlidir ($P<0.05$)

Bu çalışmada da vitrifikasyon solüsyonu (VS3) ile devitrifikasyon amacıyla payete yerleştirilen sakkaroz solüsyonu arasında hava boşluğu bırakılması durumunda payet silkelendiği esnada yoğun bir şekilde hava kabarcığı olduğu gözlenmiş, bu durumda embriyonun hem yeterince sakkaroz solüsyonu ile karışmadığı hem de mikroskopta tespit edilmesinin güçleştiği gözlenmiştir.

Tartışma

Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan in vitro sığır embriyolarının direkt transfer için embriyoların payet içerisinde devitrifiye edilme imkanlarının araştırıldığı bu çalışmada, payet içerisine vitrifikasyon solüsyonlarıyla birlikte devitrifikasyon solüsyonları da yerleştirilmiş ve çözdürülen embriyoların payet içerisinde devitrifiye olması sağlanarak işlemin başarı düzeyi ortaya konmaya çalışılmıştır.

Kontrol grubundaki canlılık oranlarının Martinez ve ark. (1998), Kızıl ve ark. (2007) ve Campos-Chillon ve ark. (2006)'nın bulgularına benzerlik gösterdiği ve kullanılan vitrifikasyon protokolü ile ilgili bir sorun olmadığı ve embriyoların vitrifikasyonla dondurulmasının uygun bir protokol olduğu gözlenmiştir. Ancak deneme gruplarında canlılık oranlarının kontrol grubuna göre düşük olması, çözdürme sonu payetlerin sallanması ile payet içerisindeki VS3 ve sakkaroz solüsyonlarının yeteri düzeyde karışmadığı ve kriyoprotektanların embriyolardan yeteri düzeyde uzaklaştırılmadığı gözlenmiştir. Bunun sebebinin payet içerisine yerleştirilen havanın, payetin sallanmasıyla birlikte çok sayıda küçük kabarcık oluşturmasıyla birlikte embriyonun payet içerisinde devitrifikasyon için uygun olmayan bir derişim bölgesine sürüklenmiş olması düşünülmüştür.

Benzer bir çalışmada Taniguchi ve ark (2007) vitrifiye ettikleri (%30 gliserol + %20 etilen glikol) sığır embriyolarında çözüm sonu kültürde %71.8 canlılık ve %7.1 zonadan çıkma oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ancak araştırmacılar vitrifikasyon solüsyonu ile 1M sakkaroz arasında hava boşluğu bırakmadan embriyoyu payete çekmişler ve hava boşluğunun solüsyonların karışmasını önlediğini belirtmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada, in vitro sığır embriyoları %10 gliserolde 5 dk., %10 gliserol + %20 etilen glikolde 5 dk. ve %25 gliserol + %25 etilen glikolde ekilibre edildikten sonra vitrifiye edilmiştir. Çözündürme sonrası 0.5M ve 0.25M sakkaroz ile kriyoprotektanlar uzaklaştırıldıktan sonra embriyolar kültür ortamına alındığında %63 (31/49) gelişim oranı, bunların transferinden ise %43 (7/16) gebelik alındığı bildirilmektedir (Martinez ve ark 1998).

Sonuç olarak vitrifikasyonla dondurulan embriyoların direkt olarak taşıyıcılara transfer edilebilmesi için embriyo, vitrifikasyon ve sakkaroz solüsyonlarının çalışmada kullanıldığı şekliyle yerleştirilmesinin uygun olmadığı ancak kriyoprotektanlarla sakkarozun payet içerisinde uygun bir şekilde karışmasını sağlayabilecek şekilde optimize edilmesi için başka çalışmaların yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

*Bu çalışma Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir (TAGEM/HAYSÜD08/01/01/01/01).

Kaynakça

- Ataman, M. B. (1998). Koyun embriyosunun dondurulması. Hayvancılık Araştırma Dergisi, 8(1-2), 38-39
- Campos-Chillon, L. F., Walker, D. J., De La Torre-Sanchez, J. F., Seidel Jr, G. E. (2006). In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. Theriogenology 65 (6), 1200-1214
- Ishimori, H., Saeki, K., Inai, M., Nagao, Y., Itasaka, J., Miki, Y., Seike, N., Kainuma, H. (1993). Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethyleneglycol and dimethylsulfoxide. Theriogenology 40 (2), 427-433
- Kanagawa, H., Shimoria, I., Saitoh, N. (1995). Manuel of Bovine Embryo Transfer. Japan Livestock Technology Association, Shirakawa, Japan.
- Kasai, M. (1997). Vitrification: refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. Journal of Mammalian Ova Research 14 (1), 17-28
- Kızıl, S. H., Akyol, N., Karşahin, T., Satılmış, M. (2007). 7 günlük in vitro sığır embriyolarının vitrifikasyonla dondurulması, Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 47 (2), 1-5
- Martinez, A. G., de Matos, D. G., Furnus, C. C., Brogliatti, G. M. (1998). In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. Theriogenology, 50 (5), 757-767
- Massip, A., Van Der Zwalm, P., Ectors, F. (1987). Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. Theriogenology, 27 (1), 69-79
- Palasz, A. T., Mapletoft, R. J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. Biotechnology Advances, 14 (2), 127-149
- Sağırkaya, H., Bağış, H. (2003). Memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 22 (1-2-3), 127-135
- Saito, N., Imai, K., Tomizawa, M. (1994). Effect of sugar-addition on survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. Theriogenology, 41 (5), 1053-1060
- Tachikawa, S., Otoi, T., Kondo, S., Mchida, T., Kasai, M. (1993). Successful vitrification of bovine blastocysts derived by in vitro maturation and fertilization. Molecular Reproduction and Development, 34 (3), 266-271
- Taniguchi, M., Ikeda, A., Arikawa, E., Wongsrikeao, P., Agung, B., Noai, H., Nagai, T., Otoi, T. (2007). Effect of cryoprotectant composition on in vitro viability of in vitro fertilized and cloned bovine embryos following vitrification and in-straw dilution. Journal of Reproduction and Development, 53 (4), 963-969
- Vicenta, J. S., Garcia-Ximenez, F.C. (1996). Direct transfer of vitrified rabbit embryos. Theriogenology, 45, 811-815
- Wright, J. M. (1998). Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In, Stringfellow DA, Seidel SM (Eds): Manual of the International Embryo Transfer Society. pp. 167-170, IETS, Illinois, 1998