

Etilen Glikol ile Direkt Transfer Metoduna Göre Dondurulan *in vivo* Sığır Embriolarının Transferi

Sedat Hamdi KIZIL *  Numan AKYOL ** Tahir KARAŞAHİN * Muharrem SATILMIŞ *

* Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, TR-06852 Ankara - TÜRKİYE

** Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, TR-06530 Ankara - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-4176

Özet

Bu çalışmanın amacı, etilen glikol direkt transfer metoduna göre dondurulan *in vivo* sığır embriolarının taşıyıcı hayvanlara nakledilerek gebelik elde edilmesidir. Projenin ilk aşamasında; 56 adet iyi kalite *in vitro* üretim sığır embriyosu etilen glikol direkt transfer metoduna göre dondurulmuştur. Çözündürme sonrası TCM-199 + 0.1mM β -merkaptöetanol + %10 fetal buzağı serumu (FCS) içeren solüsyon içerisinde, 24-48 saat inkubasyonda, 36 adet embriyonun re-ekspansiyonu ve zonadan çıktığı görülmüş, canlılık oranı %64.28 olarak tespit edilmiştir. İkinci aşamada; süperovulasyon protokolü uygulanan kültür ırkı ineklerden 8 adet iyi kalite embriyo toplanmıştır. Embriyolar 1.8M etilen glikol + 0.1M sakkaroz içeren %20 yeni doğmuş buzağı serumlu (CS) Dulbecco'nun fosfat tampon solüsyonu (D-PBS) içerisine alınarak 0.25 ml'lik steril payetlere çekilmiştir. Yerleştirme her bir payete bir embriyo olacak şekilde yapılmış ve payetler oda sıcaklığında 15 dk. ekilibrasyona bırakılmıştır. Programlanabilir dondurma cihazının, metil alkol bulunan haznesi içerisine payetler yerleştirilerek, -7°C'den itibaren soğutma işlemine başlanmıştır. -7°C'de 2 dk. sonra payetlere seeding yapılmış ve 8 dk aynı ısıda bekletilmiştir. Soğutma işlemine -30°C'ye kadar 0.3°C/dak. düşürülecek şekilde devam edilmiş ve direkt -196°C'deki sıvı azot içerisine alınarak embriyolar muhafaza altına alınmıştır. Çözündürmede, sıvı azot içerisinden alınan payet önce 5-6 sn. havada tutulmuş, 30°C'deki su banyosunda 10 sn. tutularak çözündürülmüştür. Önceden prostaglandin F2 α ile senkronize edilen 8 baş taşıyıcı inekte kızgınlığının yedinci gününde rektal palpasyon ile korpus luteum (CL) tespiti yapılmıştır. CL tespit edilen taşıyıcılara, kriyoprotektan uzaklaştırılmadan embriyolar, cerrahi olmayan yöntemle, ipsilateral olarak nakledilmiştir. Nakil sonrası 60. günde taşıyıcı hayvanların rektal palpasyon ile yapılan gebelik kontrollerinde, 5 taşıyıcı hayvanın gebe olduğu tespit edilmiş ve gebelik oranı %62.5 olarak bulunmuştur. Gebeliklerin hepsi doğumla sonuçlanmıştır. Bu çalışmada, kriyoprotektan olarak etilen glikol'ün sığır embriolarının dondurulması ve direkt transferinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Embriyo, Sığır, Etilen glikol, Direkt transfer

Transfer of *in vivo* Embryos Frozen by Direct Transfer Method with Ethylene Glycol in Cattle

Summary

The aim of this study was to be obtained pregnancy after the transfer of *in vivo* cattle embryos frozen by direct transfer method with ethylene glycol. First of all, 56 *in vitro* produced cow embryos of good quality were frozen by direct transfer method with ethylene glycol. After thawing, embryos were transferred into TCM-199 + 0.1 mM β -mercaptoethanol + 10% foetal calf Serum (FCS) medium to check *in vitro* survival at 24-48 h. The re-expansion and hatching rate of blastocysts was 64.28% (36 blastocysts). At the second stage; 8 good quality embryos were collected from superovulated culture breed cows. Embryos were equilibrated for 15 min in room temperature in 1.8M ethylene glycol + 0.1M sucrose in dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) supplemented with 20% newborn calf serum (CS). Embryos were then loaded individually into a 0.25 ml straw and placed directly into a cooling chamber of a programmable freezer with methyl alcohol precooled to -7°C. After 2 min, straw was seeded, maintained at -7°C for 8 min more, and then cooled to -30°C either at 0.3°C/min before being into liquid nitrogen. The frozen embryos were thawed by allowing the straw to stand in air for 5 to 6 sec and then immersing them in a 30°C water bath. Embryos frozen-thawed in the presence of EG were nonsurgically transferred into the uterine horn into the recipient without diluting the cryoprotectant. Synchronized recipient cows with prostaglandin F2 α were received one embryo each in the horn ipsilateral to the corpus luteum (CL). Pregnancies were diagnosed by rectal palpation 60 days after embryo transfer. Eight frozen-thawed embryos were transferred directly to eight recipients and five recipients gave birth to five normal calves. The pregnancy rate was 62.5%. This result indicated that EG can be used effectively for cattle embryo freezing and transfer as a suitable cryoprotectant.

Keywords: Embryo, Bovine, Ethylene glycol, Direct transfer



İletişim (Correspondence)



+90 312 8651196/232



sedathkizil@hotmail.com

GİRİŞ

Embriyolarının dondurulmasında, permeabl özellikteki; gliserol, dimetilsülfoksit (DMSO), propilen glikol (PG), etilen glikol (EG) ve asetamid ile permeabl olmayan; galaktoz, sakkaroz, ve trehaloz gibi sakkaritler ve makromolekül olarak da; polietilen glikol (PEG), Polivinilpirolidon (PVP), sığır serum albumini (BSA) ve Fikol 70 gibi kriyoprotektanlar kullanılmıştır ¹. Orijinal yavaş dondurma ve çözündürme yöntemlerinin dahada kolaylaştırılması sonucunda embriyo muhafaza yöntemlerinde ilerlemeler sağlanmıştır ². Fare embriyolarında, EG'nin en az toksik olduğu, bunu sırasıyla; gliserol, DMSO, PG ve asetamid'in izlediği tespit edilmiştir. %40 EG ve %18 Fikol içeren vitrifikasyon solüsyonunda sakkaroz'un bulunmasının toksik etkiyi azalttığı belirtilmiş, trehaloz, glukoz, fruktoz ve galaktoz gibi diğer bazı şekerlerinde aynı etkiyi gösterdiği vurgulanmıştır ³. EG'nin, fare ve rat embriyolarını, dondurmanın zararlı etkisinden koruduğu ve diğer türlerin embriyolarında DMSO'ye göre daha yüksek canlılık oranı elde edildiği bildirilmiştir ⁴. 1.5M EG, 1.5M PG, 1.5M DMSO ve 1.4M gliserol (GL) ile dondurulan *in vivo* embriyoların çözüm sonrası canlılık oranları sırasıyla; %70, %11, %25 ve %30 olarak tespit edilmiştir ⁵.

Embriyo nakli sonrası gebelik oranları; *in vivo* taze nakilde %70 ⁶, düve ve ineklerde yapılan bir araştırmada sırasıyla, %56.5 ve %27.2 ⁷, donmuş *in vivo* embriyo naklinde %28.57 ⁸, *in vivo* ve *in vitro* embriyoların taze naklinde sırasıyla, %64.8, %49.2 ve %9 EG ile direkt transfer donmuş nakilde, %59.0, %37.8 ⁹ bulunmuş ve 1.3M metil cellosolve (MC)'de; %48.3 ve %47.6 ve 1.8M EG'de; %50.0 ve %63.0 olarak tespit edilmiştir ¹⁰. EG, MC, dietilen glikol (DEG) ve PG ile dondurulmuş embriyoların çözündürme sonrası, canlılık ve gebelik oranları sırasıyla, %50 ve %74, %53.6 ve %48, %56.9 ve %30, %58 ve %40 olarak bulunmuştur ¹¹. 1.5M EG direkt transfer dondurma yönteminde, yüzeysel pozisyon nakil sonrası gebelik oranları, derin pozisyonda elde edilenlerden ¹² daha yüksek iken, EG direkt transfer yöntemi ile dondurulmuş ithal embriyolarda, deneme ve kontrol gruplarında sırasıyla, %50 ve %52.6 ¹³ ve gliserolle dondurulmuş ithal *in vivo* embriyolarda ise %32.81 olduğu tespit edilmiştir ¹⁴.

Bu çalışmada amaç; *in vitro* sığır embriyolarında, etilen glikol direkt transfer metodunun yapılabilirliğinin tespit

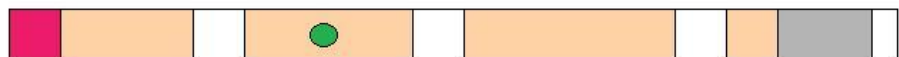
edilmesi, *in vivo* sığır embriyolarında da uygulanabilirliğinin ortaya konulması ve ardından taşıyıcı hayvanlara suni tohumlama kolaylığında nakledilerek gebelik elde edilmesidir.

MATERYAL ve METOT

Proje iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, direkt transfer metodunun *in vitro* embriyolarda uygulanma şansı araştırılmış, ikinci aşamada ise anılan metodun *in vivo* embriyolarda da yapılabilirliği tespit edilmiş ve saha koşullarında taşıyıcı hayvanlara nakledilerek gebelikler tespit edilmiştir.

İlk aşamada; mezbahadan getirilen ovaryumlardan, oosit kumulus kompleksleri, 2-8 mm çaplı folliküllerden aspire edilmiştir. Aspirasyon sonrası elde edilen oositler 100 µl'lik TCM-199 mikrodamları içerisinde 20-22 saat maturasyona tabi tutulmuştur. Bracket Oliphant (BO) mikrodamları içerisinde 5-6 saat fertilizasyon sonrası, 100 µl'lik Charles Rosencrans (CR1aa) mikrodamları içerisinde yedi gün kültüre edilmiştir. Embriyolar önce, %0.4 BSA + %20 yeni doğmuş buzağı serumu (CS) (ısı ile inaktive edilmiş) içeren D-PBS medyumunda içerisinde yer aldığı, 1.8M EG ve 0.1M sakkaroz içeren dondurma solüsyonu ile birlikte payetlere çekilmiştir. Blastosist safhasında iyi kalitede embriyolar, Şekil 1'de görüldüğü gibi her payete bir embriyo olacak şekilde yerleştirilmiş, açık payet ucu polivinil alkol ile kapatılmış ve oda sıcaklığında (25°C'de) 15 dk'da ekilibre edilmiştir. Solüsyonların ve embriyonun payet içerisindeki konumları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

Programlanabilir dondurma cihazının (CL159 Cryologic /Avustralya) metil alkol bulunan haznesi içerisine payetler yerleştirilerek, -7°C'den itibaren soğutma işlemine başlanmıştır. Aynı sıcaklık derecesinde 2 dk. bekleme sonrasında, payetlere pamuk tıkaca yakın olan kısımdan seeding yapılmış ve payetler 8dk. daha aynı sıcaklıkta bekletilmiştir. Soğutma işlemine -30°C'ye kadar 0.3°C/dk. düşürülecek şekilde devam edilmiş ve sıvı azot (-196°C) içerisine alınmıştır. Çözündürme işlemi için; payetler sıvı azot içerisinden alınmış, önce 5-6 sn. havada tutulmuş, 30°C'deki su banyosu içerisinde dondurma solüsyonunun 10 sn'de tamamen çözünmesi beklenmiştir. Sonra payetin polivinil alkol ile kapalı ucu makas ile kesilmiş ve



Şekil 1. Solüsyonların ve embriyonun payet içerisindeki konumları

Fig 1. Solutions and embryo in straw



çözündürme sonrasında embriyolar stereo mikroskop altında bulunduktan sonra, canlılıklarının kontrolü amacıyla %20 yeni doğmuş buzağı serumu (CS) içeren, D-PBS'de yıkanarak TCM-199 + 0,1 mM β-merkaptoetanol + %10 fetal buzağı serumu (FCS) içeren kültür mikrodamlar içerisine alınmıştır. %98 bağıl nem, %5 CO₂ ve 38.5°C sıcaklıktaki inkubatörde 24-48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Re-ekspanse olan ve zonadan çıkan embriyolar canlı olarak değerlendirilmiştir. Toplam olarak, 56 adet iyi kalite *in vitro* embriyo elde edilmiş ve Etilen glikol direkt transfer metoduna göre dondurulmuştur.

İkinci aşamada; süperovulasyon uygulanan ineklerden, yedi günlük yaşta ve blastosist safhasında iyi kalite *in vivo* embriyolar elde edilmiştir. Bu embriyolar önce, %0.4 BSA + %20 CS (ısı ile inaktive edilmiş) içeren D-PBS medyumunun da içerisinde yer aldığı dondurma solusyonu içerisine alınmıştır. *In vitro* embriyolarda uygulanan dondurma ve çözündürme işleminin aynısı *in vivo* embriyolara da uygulanmıştır. Dondurulan embriyoların içerisinde bulunduğu payetler, çözündürüldükten sonra, önce temiz kağıt havlu ile kurulanmış ve ardından polivinil alkol ile kapalı olan uç temiz bir makas ile kesilmiş, pamuk tıkaç kısmı aşağıda olacak şekilde nakil kateterine yerleştirilerek, taşıyıcı hayvanlara nakledilmiştir. Nakil öncesinde, prostaglandin F2α ile sinkronize edilmiş taşıyıcı ineklere, rektal palpasyon ile kızgınlığın yedinci gününde CL tespiti yapılmıştır. CL tespit edilen taşıyıcı hayvanlara, nakil öncesinde üst epidural anestezi uygulanmıştır. Nakiller, ipsilateral olarak ve her bir taşıyıcıya sadece bir kez olacak şekilde ve çözüm sonrası 15 dk. içerisinde gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı olarak seksüel siklusu normal, sağlıklı 8 baş inek kullanılmıştır. Nakilleri takip eden 60. günde rektal palpasyon ile gebelik kontrolleri yapılmıştır.

BULGULAR

In vitro üretilen, 56 adet iyi kalite inek embriyosunun dondurma çözündürme sonrası 24-48 saatlik kültüründe, 36 adet embriyonun re-ekspanse ve zonadan çıkmış olduğu görülmüştür. Canlılık oranı %64.28 olarak tespit edilmiştir. Süperovule ineklerden elde edilen 8 adet embriyo, 8 adet taşıyıcı hayvana nakledilmiştir. Nakil sonrası 60. günde, taşıyıcı hayvanların rektal palpasyon ile yapılan gebelik kontrollerinde, 5 taşıyıcının gebe olduğu tespit edilmiştir. Gebelik oranı %62.5 olarak bulunmuştur. Gebeliklerin tamamı doğumla sonuçlanmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

In vitro embriyolarda dondurma çözündürme sonrası elde etmiş olduğumuz %64.28'lik canlılık oranı sonucu, bazı araştırmacıların bildirdiklerinden yüksek ¹¹ ve bazı araştırmacıların bildirdiklerinden düşük ^{4,15} bulunmuştur. Elde edilen canlılık oranı, çalışmada uygulanan bu dondurma metodunun, dondurmaya karşı daha duyarlı olan

in vitro üretim embriyolar için uygun olduğunu ve *in vivo* embriyolarda da uygulanabileceğinin göstergesi olmuştur.

Dondurma çözündürme sonrası, *in vivo* embriyo naklinden elde etmiş olduğumuz %62.5'lik gebelik oranının, bazı araştırmacıların bildirdikleri oranlardan yüksek ¹³ bulunması, bu metodun *in vivo* sığır embriyolarında başarılı bir şekilde uygulanabileceğini ortaya koymuştur. Bazı araştırmacıların sonuçları ile uyumlu bulunması ^{9,10,12,15,17-20}, Etilen glikol direkt transfer metoduna göre *in vivo* embriyoların başarılı bir şekilde dondurulabileceğini ve çözüm sonrası taşıyıcılara nakilde, dünya literatürlerine uygun gebelik sonucu alınabileceğinin göstergesidir. Bazı araştırmacıların bildirdiklerinden düşük ^{11,16} olması ise, embriyo değerlendirilmesindeki subjektif ölçülerden, transfer sayısı ve dondurma metodu farklılıklarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; embriyo transferinin henüz yaygınlaşmadığı ülkemizde, düşük toksisiteye sahip bir kriyoprotektan olan etilen glikolün, sığır embriyolarının dondurulmasında kolaylıkla kullanılabilmesi ve çözündürülmüş embriyoların saha koşullarında güvenle uygulanabileceği kanaatine varılmıştır. Çözündürme sonrasında, payet içerisinde embriyolar kriyoprotektandan uzaklaştırılmadan ve suni tohumlama kolaylığında taşıyıcı hayvanlara direkt nakledilebilecektir. Bu çalışma; başka araştırmacıların, bu konuda yapacakları çalışmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- 1. Kasai M:** Vitrification: Refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. *J Mamm Ova Res*, 14, 17-28, 1997.
- 2. Ohboshi S:** Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. *Anim Sci Tech*, 69, 1069-1077, 1998.
- 3. Kasai M:** Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci*, 42, 67-75, 1996.
- 4. Miyamoto H, Ishibashi T:** Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J Reprod Fert*, 50, 373-375, 1977.
- 5. Voelkel SA, Hu YX:** Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 37, 687-697, 1992.
- 6. Akyol N, Kızıl SH, Tuncer PB:** İneklerde süperovulasyon ve embriyo transferi çalışmaları. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 44 (1): 1-5, 2004.
- 7. Köse M, Dursun Ş, Bülbül B, Kırbaş M:** İsviçre Esmeri ineklerde FSH ile süperovulasyon ve embriyo transferi çalışmaları. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 16 (1): 1-6, 2006.
- 8. Sungur H, Yurdaydın N:** Sığır embriyosunun dondurulması ve transferi. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 34 (1-2): 1-24, 1994.
- 9. Riha J, Machatkova M, Pavlok A:** Viability of fresh and frozen transferred IVP bovine embryos. *Czech J Anim Sci*, 47, 261-267, 2002.
- 10. Sakakibara H, Takagi M, Yamamoto M, Ooe M, Suzuki T:** Efficacy of methyl cellosolve as a cryoprotectant for cryopreservation of bovine embryos. *J Reprod Dev*, 42, 15-20, 1996.
- 11. Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H, Oe M:** Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized Bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one step system. *Theriogenology*, 40, 651-659, 1993.

12. Yamashina H: Pregnancy rates and uterine-horn positions for transfer of frozen-thawed bovine embryos. *J Japan Vet Med Assoc*, 55, 719-722, 2002.

13. Bülbül B, Dursun Ş, Kırbaş M, Köse M, Ümütlü S: Dövelerde embriyo transferi öncesi flunixin meglumin uygulamasının gebelik oranı üzerine etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (1): 105-109, 2010.

14. Sungur H, Alaçam E, Tekeli T, Kadak R, Pakdil N, Whitager RO: İsviçre Esmeri dövelerde dondurulmuş embriyo nakli uygulamaları. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 29 (1-4): 80-89, 1989.

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

16. Yamashina H: Pregnancy or abortion rates and quality of frozen-thawed bovine embryos imported from North America or Europe. *Japanese J Large Anim Clinics*, 25, 11-16, 2002.

17. Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF, Kruip T: Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology*, 42, 1275-1284, 1994.

18. Lopatarova M, Cech S, Holy L, Dolezel R: The effect of vitrification in open pulled straws on pregnancy rates after transfer of *in vivo* produced bovine embryos. *Vet Med*, 51, 454-460, 2006.

19. Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshida N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S: 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, 1051-1058, 1998.

20. Martinez AG, Brogliatti GM, Valcarcel A, De Las Heras MA: Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos a field trial. *Theriogenology*, 58, 963-972, 2002.