

İn Vitro Elde Edilen Sığır Embriyolarının Dondurulmasında Vitrifikasyon Medyumuna Maruz Kalma Sürelerinin Çözünme Sonrası Gelişim Üzerine Etkisi

Özen Banu ÖZDAŞ^{1*}, Ümüt CİRİT², Kamber DEMİR¹, Süleyman BACINOĞLU³,
Alper BARAN¹, Serhat PABUCCUOĞLU¹, Tülay İREZ⁴, Serhat ALKAN¹, Kemal AK¹

¹İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, 34320 Avcılar, İstanbul

²Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Diyarbakır

³BIOPHARM Aşı ve İlaç San. Tic. LTD. ŞTİ. Dolayoba Caddesi Tolga Sokak No: 3, 34896 Pendik, İstanbul

⁴İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Cerrahpaşa, İstanbul

*Sorumlu Yazar: Özen Banu ÖZDAŞ İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı,
34320 Avcılar, İstanbul
e-posta: ozenbanu@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi /Received: 04.05.2011

ÖZET

Günümüzde dondurulmuş embriyoların transferi ile üstün verim özelliklerine sahip sürülerin oluşturulması, hastalıkların kontrolü ve genetik materyallerin uzun süre saklanması mümkün olabilmektedir. Ancak donmuş embriyolarda eritme sonrası transfer edilebilir embriyo eldesi ve gebelik oranları istenilen düzeyde değildir. Özellikle embriyoların dondurulması sırasında dejenerasyonlar oluşmaktadır. Dejenerasyonların, embriyoların kriyoprotektif maddelere maruz kalma süreleri ile toksik etkilerinden meydana geldiği düşünülmektedir. Çalışmada mezbahada kesilen sığırların ovaryumları kullanıldı. Aspirasyon yöntemi ile elde edilen oositler (1290 adet) TCM-199 da 22-24 saat süreyle %5 CO₂, %5 O₂, %90N₂ gaz atmosferinde 38,8 °C de in vitro olarak olgunlaştırıldılar. Olgun oositler IVF-TALP medyumunda 18-24 saat süreyle fertilize edildiler. Fertilizasyon sonrası 48. saatte cleavage %67,05 (865/1290) saptandı. Embriyolar %10 FCS'li SOF medyumunda 7 gün süreyle %5 CO₂, %5 O₂, %90N₂ gaz karışımında blastosist (%34,91; 302/865) aşamasına kadar inkübe edildiler. Erken blastosist-blastosist aşamasına ulaşan 302 adet embriyodan 254 tanesi vitrifikasyon solüsyonunda farklı sürelerle (15, 30, 60, 90 sn) maruz bırakılarak donduruldular. Bu amaçla sırasıyla 4 grup oluşturuldu. Her grup sırasıyla 67, 64, 63 ve 60 embriyo içerdi (Grup 1, 2, 3, 4). Embriyolar önce % 10 Gliserol + % 10 FCS içeren PBS solüsyonunda (Vs1) 5 dk, sonra %10 Gliserol + %10 FCS+ %20 Etilen Glikollü PBS'de (Vs2) 5 dk. bekletildiler. Daha sonra embriyolar payet içindeki %25 Gliserol + %20 Etilen Glikol + %10 FCS + 0,1 M Sükroz vitrifikasyon solüsyonuna (Vs3) aktarıldılar ve değişik sürelerle (15, 30, 60, 90 sn) maruz bırakıldıktan sonra sıvı azota daldırılarak donduruldular. Eritme sonrası (37°C) embriyolar birkaç kez yıkama medyumunda ve SOF medyumunda yıkandıktan sonra, her bir gruba ait embriyolar 48 saat süreyle tekrar inkübe edildiler. Çalışmada istatistiki analizde ki-kare testi kullanıldı. Eritme sonrası, genişlemiş blastosist-zonadan çıkma safhasında en iyi gelişim %52,2 (35/67) ile Grup 1 de saptanırken, bunu %45,3 (29/64) ile Grup 2, %22,2 (14/63) ile Grup 3 ve %5 (3/60) ile Grup 4 takip etti. Grup I ve II arasında istatikselsel bir fark bulunmadı. Grup 1 ile Grup 3 arasındaki istatistikselsel fark P<0,01, Grup 1 ile Grup 4 arasında ise P<0,001 düzeyinde anlamlı bulundu.

Anahtar Kelimeler: Sığır, embriyo, in vitro, vitrifikasyon, kriyoprotektan

ABSTRACT

EFFECT OF EXPOSURE DURATION TO THE VITRIFICATION MEDIUM ON THE POST THAW DEVELOPMENT OF IN VITRO DERIVED BOVINE EMBRYOS

Transfer of frozen embryos enables the establishment of elite herds, control of diseases and storage of genetic materials for longer periods. However, although intercontinental transfer of frozen embryos is possible, post-thaw degenerations are encountered and pregnancy rates are not at the expected level. Embryos especially degenerate during freezing and thawing procedures. These degenerations are thought to be due to the exposure time and toxic effects of used cryoprotectants. In this study slaughtered cattle ovaries were used. Oocytes were collected from ovaries using the aspiration method and matured in their own group in 700 microliter TCM-199 for 22-24 h at a gas atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ at 38.8 °C. Matured oocytes were fertilized for 18-24 h in IVF-TALP medium. After fertilization cleavage was 67.05% (865/1290) at 48th h. Embryos were cultured up to early blastocyst-blastocyst stage (34.91%; 302/865) in SOF medium supplemented with 10 % FCS for 7 days at a gas atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ at 38.8 °C. 302 embryos at the early blastocyst stage were frozen after an exposure to vitrification solution for various time periods (15, 30, 60, and 90 sec). Four groups have been established for this purpose (Groups 1, 2, 3, 4). Each group has included 67, 64, 63 and 60 embryos, respectively. All embryos were first kept in PBS solution containing 10% Glycerol + 10% FCS (Vs1) for 5 minutes and then in PBS containing 10% Glycerol+10% FCS+20% Ethylene Glycol (Vs2) solution for 5 minutes. Later, embryos were taken to straw containing vitrification solution (Vs3), 25% Glycerol + 10% FCS + 25% Ethylene Glycol + 0.1 M sucrose, and exposed for various time periods (15, 30, 60 and 90 sec), then frozen by dipping into liquid nitrogen. After thawing (37 °C) embryos were washed several times in washing medium supplemented with 0.5 M sucrose and SOF medium, then embryos of each group were incubated again for another 48 hours. Chi-square test was used in this study. Post thaw development to expanded blastocyst stage was highest in Group 1 with 52.2% (35/67) followed by Group 2 with 45.3% (29/64), Group 3 with 22.2% (14/63) and Group 4 with 5% (3/60). No statistical significance was observed between Groups 1 and 2. The statistical difference between Group 1 and 3 and between Group 1 and 4 were at P<0.01 and P<0.001 levels, respectively.

KeyWords: Cattle, embryo, in vitro, vitrification, cryoprotectant

Giriş

Son yıllarda yüzlerce memeli hayvan türü yok olmakla beraber, mevcut popülasyonların dörtte üçü de yok olma tehlikesi ile karşı karşıya bulunmaktadır. Birçok ülke, memeli hayvanların gen kaynaklarının korunması amacıyla, kriyoprezervasyon çalışmalarına devam etmektedir. Bu amaçla, çeşitli hayvan türlerinde ve hatta insanlarda oosit, follikül, ovarium korteksi ve çeşitli bölünme dönemlerindeki embriyolar dondurulmakta ve hücreler uzun yıllar saklanmaktadır (Chen, 1986; Demirci ve ark., 2003; Hoshi, 2003; Lim ve ark., 2008). Günümüzde dondurulmuş embriyo-ların transferi ile üstün verim özelliklerine sahip sürülerin oluşturulması, hastalıkların kontrolü ve genetik materyallerin uzun süre saklanması mümkün olabilmektedir (Bavister, 2000; Demirci ve ark., 2003; Lim ve ark., 2008). Donmuş embriyoların ülkelerarası transferi mümkün olmakla beraber eritme

sonrasında dejenerasyonlar görülmektedir (Lim ve ark., 2008; Menezo, 2004). Bu sebeple elde edilen gebelik oranları halen istenilen düzeyde değildir. Özellikle embriyoların dondurulması sırasında dejenerasyonlar oluşmaktadır (Chen, 1982; Lim ve ark., 2008; Menezo, 2004). Dondurma solüsyonu olarak DMSO, etilen glikol, gliserol, propilen glikol ve sükröz gibi kriyoprotektan maddeler kullanılmaktadır (Cho ve ark., 2002a ve b; Dochi ve ark., 1995; Lim ve ark., 2008). Bunun yanı sıra FCS ve BSA gibi maddeler kriyoprotektan olarak geniş çapta kullanılmaktadır (Bavister, 2000; Enriğt ve ark., 2000; Rizos ve ark., 2003; Stojkovic ve ark., 2002). Son yıllara kadar embriyolar düşük konsantrasyonlu kriyoprotektan maddeler içeren dondurma solüsyonlarında kademeli olarak bekletilerek donduruluyorlardı (Martinez ve ark., 2002; Menezo, 2004). Ancak günümüzde, birçok araştırmacı vitrifikasyon yöntemi ile embriyoları dondurmakta ve bu

yöntemin daha avantajlı olduğunu belirtmektedir. Vitrifikasyon yönteminde yüksek konsantrasyonda dondurma solüsyonlarında kademeli olarak kısa süre bırakılan embriyolar daha sonra hızlı bir şekilde dondurulmaktadır. Bir çok araştırmacı oosit ve embriyoların dondurulmaları ve eritilmeleri sırasında hücre iskeleti yapısında dönüşümsüz hasarlar meydana geldiğini belirtmiştir (Demirci ve ark., 2003). Kriyoprezervasyon teknikleri ile ilgili araştırmalarda, dejenerasyonların, kullanılan kriyoprotektan maddesi ve konsantrasyonuna, dondurma ve eritme oranlarına, buz kristallerinin oluşumunun indüklenmesine (seeding) ve dondurma ısısına, eritme ısısı, ve kriyoprotektanların embriyolardan uzaklaştırılması sırasında ve embriyoların kriyoprotektan maddelere maruz kalma süreleri ile toksik etkilerine bağlı olarak meydana geldiği belirtilmektedir (Cho ve ark., 2002a; Fahning ve Garcia, 1992; Imai ve ark., 2002). Bu çalışmada, in vitro olarak SOF medyumunda üretilen sığır embriyolarının, vitrifikasyon (hızlı dondurma) metoduyla dondurulması sırasında, donma öncesi embriyoların kriyoprotektanlara maruz kalma sürelerinin eritme sonrası 48 saatlik embriyonik gelişimlerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma, üstün verimli sığırlardan elde edilen embriyoların transferi, genetik materyallerin elde tutulması ve ülkemizde hayvan ıslahının hızlandırılması gibi gelecek projeler için önemli bir basamak oluşturacaktır.

Gereç ve Yöntem

Oosit toplanması ve in vitro olgunlaştırma

Çalışmada mezbahada kesilen Holstein ırkı sığırların ovaryumları kullanıldı. Kesim sonrası elde edilen ovaryumlar 35 °C de %5 Fetal calf serum (FCS) içeren PBS solüsyonuna aktarılıp 2 saat gibi kısa bir sürede laboratuara getirildiler. Ovaryumlar yine PBS solüsyonu ile 3 kez yıkandıktan sonra, yine 35°C lik su banyosuna aktarıldılar. Oositler 2-8 mm çapındaki folliküllerden aspirasyon cihazı ile 18 G iğne kullanılarak elde edildiler. Etrafında en az 3 sıra kumulus ooforus hücre kompleksi bulunan oositler olgunlaşma için

seçildiler ve seçilen oositler yıkama medyumunda (TCM-199) üç kez yıkandılar. Yıkanan oositler, %10 FCS, piruvat, LH, L-Glutamin içeren 700 µl olgunlaşma medyumuna (TCM-199) aktarılıp, %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ gaz atmosferinde 38,8 °C de 4'lü petrilere (her bir gözde 25-30 adet oosit olacak şekilde) 23 saat süre ile olgunlaştırıldılar.

İn vitro fertilizasyon

Olgunlaşma sonrasında kumulus genişlemesi (ekspansiyonu) gösteren oositler fertilizasyon için seçildiler. Çalışmada fertilizasyon için donmuş sperma kullanıldı. Bu amaçla 2 adet payet 37 °C de 30 sn süreyle eritildi. Eritilen sperma santrifüj yöntemi ile 2 kez SPERM-TALP medyumunda yıkandı (Avery ve Greve, 1995). Yıkanan spermanın üst süpernatantı atıldıktan sonra, üzerine yine 0,5 ml SPERM-TALP medyumunu eklendi. Daha sonra mililitrede 2,5-3,0x10⁶ adet spermatozoon olacak şekilde hesaplanan sperma süspansiyonu, içinde oosit bulunan IVF-TALP medyumuna eklenerek 18-24 saat süre ile %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ gaz atmosferinde 38,8 °C de fertilizasyona bırakıldılar.

İn vitro kültür

Fertilizasyon sonrasında in vitro kültürde SOF (syntetic oviduct fluid) medyumunu kullanıldı (Avery ve Greve, 1995; Bavister, 2000; Carolan ve ark., 1995). Fertilizasyon sonrası zigot olduğu tahmin edilen embriyolar kumulus hücrelerinden arındırılmak amacıyla, 120 sn süre ile yıkama medyumunda (TCM-199) 3000 devirde karıştırıldılar. Spermadan ve kumulus hücrelerinden ayrılan embriyolar üç kez yıkama ve bir kez SOF medyumunda yıkandıktan sonra mineral yağ altındaki %10 FCS'li SOF medyumunu kültür damlalarına aktarılıp %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ gaz atmosferinde 38,8 °C de 7 gün süre ile inkübasyona bırakıldılar. Her bir damlaya 15-30 adet zigot konulmasına dikkat edildi.

Payetlerin hazırlanması ve embriyoların dondurulması

Yedi günlük kültür sonunda erken blastosist ve blastosist aşamasına ulaşan embriyolardan dondurulmaya uygun olanlar seçildiler. Bunun

yanı sıra her bir deney grubunda seçilen embriyolardan bir kısmı toksisite testine tabii tutuldular.

Embriyoların vitrifikasyonunda kullanılmak üzere 3 farklı dondurma ve sükröz solüsyonu hazırlandı.

Vs1: %10 Etilen glikol + % 10FCS li PBS solüsyonu

Vs2: %20 Etilen glikol + % 10Gliserol ve %10 FCS li PBS solüsyonu

Vs3: %25 Etilen glikol + %25 Gliserol + 0,1 M sükröz içeren PBS solüsyonu

Sükröz solüsyonu: 0,5 M sükröz içeren PBS

Embriyoların dondurulmasında 0,25 ml lik payetler kullanıldı. Payetlere önce 7,5 cm uzunluğunda kolon olacak şekilde 0,5 M sükröz (PBS) solüsyonu çekildi. Daha sonra 0,5 cm hava boşluğu bırakıldı ve 1 cm Vs3 (Vitrifikasyon solüsyonu) çekildi ve tekrar 0,5 cm sükröz solüsyonu çekilerek payetler önceden hazırlandı.

Çalışmada embriyolar dondurma solüsyonunda farklı sürelerle (15, 30, 60, 90 sn) maruz bırakılarak dondurulması amaçlandığından 4 farklı grup oluşturuldu. Grup 1 (15 sn), Grup 2 (30 sn), Grup 3 (60 sn), Grup 4 (90 sn) (Tablo1).

Embriyolar vitrifikasyon için önce oda ısısındaki Vs 1 medyumunda (%10 Etilen glikol + %10 FCS'li PBS) 5 dakika sonra Vs2 medyumunda (%20 Etilen glikol + %10 Gliserol + %10 FCS'li PBS) 5 dakika bekletildiler. Daha sonra embriyolar bir pipet ile hazırlanmış payetteki Vs3 solüsyonuna %25 Etilen glikol + %25 Gliserol + 0,1 M sükröz içeren PBS solüsyonuna yerleştirildiler ve değişik sürelerle (15, 30, 60, 90 sn) maruz bırakıldıktan sonra payetler sıvı nitrojene vertikal olarak daldırılarak hızlı bir şekilde donduruldular. Bu gruptan farklı olarak toksisite testi için ayrılan embriyolar dondurma aşamasına kadar Vs1, Vs2 (5 er dakika) ve Vs3 (15 sn) işlemlerine maruz bırakılmış ancak dondurulmamıştır. Dondurulmayan embriyolar, rehidrasyonu sağlamak için ve kriyoprotektan maddelerden arındırılmak için 0,5 M sükrözlü PBS solüsyonunda 5 dakika, 0,25 M sükröz

içeren PBS solüsyonunda 5 dakika bekletildikten sonra, daha önceden gazlaması yapılan SOF medyumunda 3 kez yıkanmış ve yine SOF kültür medyumunda %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ gaz atmosferinde 38,8 °C de 48 saat süre ile kültüre edildiler.

Embriyoların eritilmesi

Sıvı nitrojen tankından alınan payetler 5 sn gibi bir süreyle oda ısısında tutulduktan sonra, direkt olarak 37 °C lik su banyosuna atıldılar ve 30 sn süre ile eritildiler. Eritme sonrası her bir gruba ait olan embriyolar, rehidrasyonu sağlamak için ve kryoprotektif maddelerden arındırılmak amacıyla, 0,5 M sükrözlü PBS solüsyonunda 5 dakika, 0,25 M sükröz içeren PBS solüsyonunda 5 dakika bekletildiler. Sonra embriyolar daha önceden gazlaması yapılan SOF medyumunda 3 kez pasajlandılar ve yine SOF kültür medyumunda %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ gaz atmosferinde 38,8 °C de 48 saat süre ile kültüre edildiler.

Bulgular

Çalışmada her bir gruba ait elde edilen sonuçların istatistiksel analizinde ki-kare (χ^2) testi kullanıldı. Aspirasyon yöntemi ile 1535 adet oosit elde edilmesine karşın 1290 adet oosit in vitro kültürde kullanılmıştır (%84,03). Fertilize edilen oositlerin 48. saatte 865 adedi bölünme gösterirken, bu oran %67,05 olarak saptandı (865/1290). Bölünme gösteren embriyoların 7 günlük kültür sonunda erken blastosist-blastosiste ulaşma oranı %34,91 (302/865) bulundu. Blastosist aşamasına ulaşan embriyolardan 48 adedi toksisite testi için kullanıldı. Toksisite testi uygulanan embriyolardan sadece 34 adedi gelişimine devam etti (%70,83). Geriye kalan erken blastosist-blastosist aşamasındaki 254 adet embriyo 4 gruba ayrılarak donduruldu ve eritme sonrası, genişlemiş ve zonasından ayrılan embriyoların gelişimleri 48 saat süreyle takip edildi (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı sürelerle maruz bırakılarak vitriyeye edilen genişlemiş ve zonasından ayrılan embriyoların eritme sonrası gelişimleri.

Table 1. Post-thaw development of expanded blastocyst and hatching stage embryos exposed to various periods and vitrified

Gruplar	Dondurulan Embriyo Sayısı	Eritme Sonrası Gelişim (48 saat)
Grup 1 (15 sn)	67	35 (%52,2) ^{c*}
Grup 2 (30 sn)	64	29 (%45,3) ^c
Grup 3 (60 sn)	63	14 (%22,2) ^b
Grup 4 (90 sn)	60	3 (%5,0) ^{a*}

^{a,b,c} Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).

*:P<0,001

Tartışma ve Sonuç

Oositlerde *in vitro* fertilizasyon sonrası bölünme oranı %67,05, erken blastosist-blastosiste ulaşma oranı ise %34,91 saptanmıştır. Bulunan bu blastosiste ulaşma oranları dünyadaki diğer sonuçlarla hemen hemen aynıdır (Enright ve ark., 2000). Vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan embriyoların eritme sonrası 48. saatteki gelişim oranlarında en iyi sonuç %52,2 ile Grup 1 de saptanırken, bunu %45,3 ile Grup 2 takip etmiştir. Bulunan bu değerler Lim ve ark. (2008) bulduğu sonuçlarla paraleldir. Ancak her ne kadar eritme sonrası embriyo gelişimi %52,2 bulunsada bu oran *in vivo* elde edilen dondurulup-eritilmiş embriyoların gelişim oranlarına göre düşüktür ve bu da beklenen bir sonuçtur (Enright ve ark., 2000; Ohboshi ve ark., 1997; Sommerfeld ve Niemann, 1999). Eritme sonrası en kötü gelişim ise %5 ile Grup 4'te saptanmıştır. Grup 4 için bu değer, istatistiksel olarak, Grup 1 ile karşılaştırıldığında P<0,001 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu sonuç bize embriyoların dondurulması sırasında kriyoprotektan maddelere maruz kalma süresinin ve yine bu maddelerin toksik etkilerinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Yaptığımız çalışmada embriyoların vitrifikasyon öncesi 60 sn süre ile yoğun kriyoprotektanlara maruz bırakılması, eritme sonrası embriyo gelişimini %50 ve üzeri bir oranda negatif yönde etkilemiştir (Tablo 1). Uzun süre kriyoprotektan maddelere maruz kalan embriyoların hücre yapısında dönüşümsüz bozukluklar meydana gelmektedir (Lim ve ark., 2008; Martinez ve ark., 2002; Menezo, 2004). Bununla beraber, embriyoların dondu-

rulması ve eritilmesi sırasında da embriyolarda kısmen ya da tamamen dejenerasyonlar meydana gelmektedir. Bu konu tartışma ve sonuç bölümünde tekrar değerlendirilecektir. Çeşitli embriyo kriyoprezervasyon teknikleri dünyadaki birçok laboratuvar tarafından geliştirilmiştir (Lim ve ark., 2008). Ancak birçok memeli türünde *in vitro* olarak üretilen embriyolar blastosist aşamasına ulaşmasına rağmen, elde edilen embriyolar kalite ve sayı açısından yeterli değildir (Bavister, 2000). Kriyoprezervasyon çalışmalarında çok çeşitli ve değişik konsantrasyonlarda ve sıklıkla birbiriyle kombinasyonlu olarak kriyoprotektanlar kullanılmaktadır (Lim ve ark., 2008). Hücre içi ve dışı olarak adlandırılan bu kriyoprotektanlar aynı zamanda düşük yada yüksek molekül ağırlıklı olmalarına göre sınıflandırılırlar (Lim ve ark., 2008; Menezo, 2004; Stojkovic ve ark., 2002). Hücre içi kriyoprotektanlarından gliserol ve etilen glikol yavaş dondurma ve vitrifikasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Şeker ve proteinler gibi yüksek molekül ağırlığına sahip maddeler hücre dışı kriyoprotektanlar olarak kullanılırlar (Lim ve ark., 2008). Embriyo dondurma çalışmalarında, geniş ölçüde tanımlanmamış proteinleri içeren BSA ve serum gibi maddeler dondurma solüsyonlarına eklenmektedir (Ali ve Shelton, 1993; Cho ve ark., 2002b; Lim ve ark., 2007). Biyolojik proteinler embriyo dondurulmasında faydalı rol üstlenmeler de *in vitro* embriyo üretiminde kullanılan bu proteinler iri buzağı sendromu sıklığını artırırlar (Lim ve ark., 2007; Young ve ark., 1998). Çalışmamızda kriyoprotektan olarak etilen glikol ve

gliserol'un yanı sıra kriyoprotektif etkilerinden dolayı FCS ve sükröz kullanılmıştır (Bavister, 2000; Enright ve ark., 2000; Rizos ve ark., 2003; Stojkovic ve ark., 2002). Kriyoprotektan maddeler bir yandan embriyo ve dokular için koruyucu etkiye sahipken, diğer yandan toksik etkilerinden dolayı, embriyo ve dokuların kriyoprotektanlara maruz kalma süreleri düşünülmelidir (Demirci ve ark., 2003; Stojkovic ve ark., 2002). Aynı zamanda payet içindeki vitrifikasyon solüsyonunun hacmi hızlı dondurma yönteminde önem taşımaktadır (Isachenko ve ark., 2003; Papis ve ark., 2000). Elde ettiğimiz sonuçları incelediğimizde, en iyi eritme sonrası embriyo gelişimi %52,2 ile Grup 1'de bulunurken en kötü sonuç ise %5 ile Grup 4'te saptanmıştır. Bu sonuçlar bazı araştırmacıların kriyoprotektanlara maruz kalma sürelerinin ne kadar önemli olduğu tezini desteklemektedir. Çünkü Grup 1'de embriyolar donma öncesi 15 sn kadar yoğun kriyoprotektif maddelere maruz kalırken, Grup 4'teki embriyolar altı kat daha fazla süreye maruz kalmıştır. Bu sonuç Grup 1 lehine olmak üzere $P < 0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Grup 2'deki embriyolar Grup 1'e göre 30 sn (2 kat) süre ile kriyoprotektanlara maruz kalmalarına rağmen eritme sonrası embriyo gelişimleri %45,3 bulunmuş ve her iki grup arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Bu da embriyoların belirli bir zamana kadar kriyotoleransının olduğunu göstermektedir. Ancak şu da çok iyi bilinmektedir ki embriyolarda soğuğa karşı bir stres oluşmakta ve buna bağlı olarak da embriyolarda dejenerasyonlar meydana gelmektedir (Lim ve ark., 2008). Kriyoprotektif maddeler her ne kadar hücre içi sıvının dışarı akmasını sağlayarak donma sırasında, küçük ve çok sayıda buz kristallerinin oluşmasını sağlasa da, toksik etkilerinden dolayı embriyolarla uzun süre muamele edilmemelidir. Kriyoprotektanlara bağlı olarak hücre membranında ve lipid yapısında meydana gelen değişiklikler nedeniyle, eritme sonrasında, hücrede hızlı şişme ve suyun tekrar hücre içine girmesi sonucu embriyolar gelişimlerine devam edememektedirler (Lim ve ark., 2008). Yaptığımız çalışmada, embriyoların sırasıyla

15, 30, 60, 90 saniye süreyle kriyoprotektanlara maruz bırakılması sonucunda gelişim oranları %52,2, %45,3, %22,2, %5 olarak saptanmış ve bu sonuçlar bize kriyoprotektanlara maruz bırakılma süresinin son derece önemli olduğunu göstermiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre vitrifikasyon yönteminin daha da geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Teşekkür

Bu proje İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 277/22092004.

KAYNAKLAR

- Ali, J., Shelton, J.N., 1993.** Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 99, 471-477.
- Avery, B., Greve, T., 1995.** Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology* 44, 871-878.
- Bavister, B.D., 2000.** Interaction between embryos and the culture milieu. *Theriogenology* 53, 619-626.
- Carolan, C., Lonergan, P., Van Langendonck, A., Mermillod, P., 1995.** Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocytes maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 43, 1115-1128.
- Chen, C., 1986.** Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1, 884-886.
- Cho, S.K., Cho, S.G., Bae, I.H., Park, C.S., Kong, I.K., 2002a.** Improvement in post-thaw viability of in-vitro produced bovine blastocyst vitrified by glass micropipette. *Animal Reproduction Science* 73, 151-158.
- Cho, S.R., Cho, S.K., Lee, S.I., Lee, H.J., Choe, S.Y., Rho, G.J., 2002b.** Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced in vitro serum free medium. *Journal Assisted Reproduction and Genetics* 19, 487-492.
- Demirci, B., Lomage, J., Salle, B., Poirel, M.T., Guerin, J.F., Franck, M., 2003.** The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. *Theriogenology* 60, 999-1010.
- Dochi, O., Imai, K., Takakura, H., 1995.** Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Animal Reproduction Science* 38, 179-185.

- Enright, B.P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F.A., Yang, X., Boland, M.P., 2000.** Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54, 659-673.
- Fahning, M.L., Garcia, M.A., 1992.** Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 29, 1-18.
- Hoshi, H., 2003.** In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59, 675-685.
- Imai, K., Matoba, S., Dochi, O., Shimohira, I., 2002.** Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vivo produced bovine embryo. *Journal of Veterinary Medicine Science* 64, 887-891.
- Isachenko, V., Alabart, J.L., Dattena, M., Nawroth, F., Cappai, P., Isachenko, E., Cocero, M.J., Oliveira, J., Roche, A., Accardo, C., Krivokharchenko, A., Folch, J., 2003.** New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology* 59, 1209-1218.
- Lim, K.T., Jang, G., Ko, K.H., Lee, W.W., Park, H.J., Kim, J.J., Kang, S.K., Lee, B.C., 2008.** Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. *Animal Reproduction Science* 103, 239-248.
- Martinez, A.G., Valcárcel, A., Heras M.A., Matos, D.G., Furnus, C., Brogliatti, G., 2002.** Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Animal Reproduction Science* 73, 11-21.
- Menezo, Y., 2004.** Cryopreservation of IVF embryos: Which stage? *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 113, 28-32.
- 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, 27-36.
- Papis, K., Shimizu, M., Izaïke, Y., 2000.** Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 54, 651-658.
- Rizos, D., Guterrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., Fuente, J., Boland, M.P., Lonergan, P., 2003.** Bovine embryo culture in the presence of absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction* 68, 236-243.
- Sommerfeld, V., Niemann, H., 1999.** Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 38, 95-105.
- Stojkovic, M., Kollé, S., Peinl, S., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Thompson, J.G., Wenigerkind, H., Reichenbach, H.D., Sinowatz, F., Wolf, E., 2002.** Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 124, 141-153.
- Young, L.E., Sinclair, K.D., Wilmut, I., 1998.** Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews Reproduction* 3, 155-163.