

## ***In vivo* elde edilen Saanen keçisi embriyolarının yavaş dondurulması üzerine farklı kriyoprotektanların etkisinin karşılaştırılması\***

**Sakine Ülküm ÇİZMECİ<sup>1</sup>, Mehmet GÜLER<sup>1</sup>, Mustafa KAYMAZ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Konya, <sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

**Özet:** Bu çalışmada farklı kriyoprotektanların, yavaş dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülmüş Saanen keçisi embriyolarının canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın hayvan materyalini 15 baş Saanen ırkı keçi ve 3 baş teke oluşturdu. Keçilere siklusun dönemi gözetilmeksizin 12 gün süreyle fluorogeston asetat (20 mg) emdirilmiş intravaginal sünger yerleştirildi. Sünger uygulamasının 9. gününden itibaren 3 gün süreyle 12 saat arayla azalan dozlarda folikül uyarıcı hormon (FSH) (50-50; 30-30; 20-20 mg) kas içi yolla enjekte edildi. Sünger çıkarıldıktan 24 saat sonra doğal aşım yaptırıldı. İlk aşımdan sonraki 7. gün laparatomik uterus yıkaması yapılarak embriyolar elde edildi. Toplanan embriyolar 3 farklı kriyoprotektan [etilen glikol (EG), gliserol ve dimetil sulfoksit (DMSO)] kullanılarak yavaş dondurma yöntemiyle donduruldu. Çözürülen embriyolar 38.5 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'de inkübasyona bırakıldı ve 24, 48 ve 72. saatlerde canlılık muayeneleri yapıldı. Çalışmada süperovulasyon cevabı ( $\geq 4$  Cl) %93.3, embriyo toplama oranı %72.3, transfer edilebilir embriyo oranı ise %58 olarak belirlendi. Dondurulup çözürülen embriyoların 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlılık oranları EG'de %64.86; %56.76; %54.05, gliserolde %54.55; %45.45; %36.36, DMSO da ise %46.88; %40.63; %28.13 olarak belirlendi. Embriyoların 72. saate ulaşmalarında EG ile dondurulanların gliserol ve DMSO ile dondurulanlardan istatistik olarak daha iyi olduğu tespit edildi ( $P<0.05$ ). Saatlere göre blastosistlerin yaşama oranları EG'de %76; %64; %60, gliserolde %54.6; %45.5; %36.4 ve DMSO'da %42.1; %36.8; %21.1 olarak belirlendi ve 72. saatte EG ve DMSO arasında farkın önemli olduğu görüldü ( $P<0.05$ ). Yapılan çalışma sonucunda çözürme sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlılık oranları EG ile dondurulan embriyolarda diğer kriyoprotektanlarla dondurulanlardan daha yüksek olduğu belirlendi.

Anahtar sözcükler: DMSO, etilen glikol, gliserol, keçi, yavaş dondurma.

### **Comparison of different cryoprotectants on slow freezing of *in vivo* derived Saanen goats embryos**

**Summary:** This study aimed to determine the effects of different cryoprotectants on the viability of Saanen goats embryos which were frozen and thawed with slow freezing method. The study was conducted on 15 Saanen goats and 3 bucks. Fluorogeston acetate (20 mg) impregnated intravaginal sponges were inserted in goats for 12 days regardless of the sexual cycle. Starting on the 9<sup>th</sup> day of intravaginal sponge administration, follicle stimulating hormone (FSH) was injected intramuscularly, every 12 hours at decreasing doses (50-50; 30-30; 20-20 mg) for 3 days. Goats were mated naturally 24 hours after removal of the sponges. Embryos were recovered by laparotomic uterine flushing on the 7<sup>th</sup> day after the first mating. Collected embryos were frozen by using 3 different cryoprotectants [ethylene glycol (EG), glycerol, and dimetil sulfoksit DMSO)] with slow freezing technique. Thawed embryos were incubated at 38.5 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The viability of embryos was evaluated at the 24<sup>th</sup>, the 48<sup>th</sup>, the 72<sup>nd</sup> hours after thawing. Superovulation response ( $\geq 4$  Cl), embryo recovery rate and transferable embryo rate were found to be 93.3%, 72.3% and 58%, respectively. Viability rates of frozen and thawed embryos at the 24<sup>th</sup>, the 48<sup>th</sup>, the 72<sup>nd</sup> hours were found respectively to be 64.86%; 56.76%; 54.05% in EG group, 54.55%, 45.45%; 36.36% in glycerol group and 46.88%; 40.63%; 28.13% in DMSO group. Viability rates of the frozen embryos with EG were statistically better than embryos frozen with glycerol and DMSO ( $P<0.05$ ) at 72<sup>nd</sup> hour. Survival rates of blastocysts frozen were 76%; 64%; 60%; 54.6% in EG group 45.5%; 36.4% in glycerol group, and 42.1%; 36.8%; 21.1% in DMSO group and at 72<sup>nd</sup> hour the difference between EG and DMSO group was significant ( $P<0.05$ ). In conclusion, viability of embryos at the 24<sup>th</sup>, the 48<sup>th</sup>, the 72<sup>nd</sup> hours after thawing in EG group was significantly higher than the embryos frozen with other cryoprotectants.

Keywords: DMSO, ethylene glycol, glycerol, goat, slow freezing.

\* Bu makale "In Vivo Olarak Elde Edilen Saanen Keçisi Embriyolarının Farklı Kriyoprotektanlar Kullanılarak Yavaş Yöntemle Dondurulması" isimli tez projesinin özetidir.

## Giriş

Süperovulasyon ve embriyo transferi (MOET) rutin bir üreme teknolojisi değildir. Ancak bu teknik sayesinde seçilmiş dişi ve erkeklerden üretilen embriyoların nakledilmesi ile çok daha hızlı bir genetik ilerleme sağlanmaktadır (28).

Embriyoların dondurularak saklanması; genetik değeri yüksek dişilerin yavrularının başka bölgelerde de yayılımının sağlanması, genetik ıslahın ve taşımanın kolay olması, gen kaynaklarının korunması ve depolanması gibi birçok avantajı vardır (3, 32). Bunun yanında dondurma işlemleri esnasında hücrelerde bir takım hasarlar meydana geldiği (15, 23) canlılık ve gebelik oranlarında düşüşler yaşandığı bildirilmiştir (24, 40).

Elde edilen embriyolar, buldukları hal ile korunmaları ve çözdürüldüklerinde yaşamlarına kaldıkları yerden devam edebilmeleri amacıyla dondurulurlar (15). Embriyoların dondurularak saklanmasıyla metabolizma, gelişim, bölünme ve hücrenin enzim aktivitesi gibi birçok olay neredeyse durmakta, bu sayede çok uzun süre yaşama yeteneğine zarar vermeden ve genetiği bozulmadan saklanabilmektedir (14, 15).

Kriyoprotektanlar, dondurma ve çözme uygulamalarının hücreler üzerinde oluşturabileceği bazı zararları önlemek amacıyla kullanılırlar ve ortamdaki donmamış fraksiyon miktarını artırıp iyon miktarını azaltarak etki göstermektedirler (27). Gliserol, dimetil sulfoksit (DMSO) ve etilen glikol (EG), küçük moleküllü kriyoprotektanlardır ve dondurma esnasında buz haline dönüşen hücre içi ve hücre dışı su miktarını sınırlamaktadırlar (29). EG, molekül ağırlığının gliserol ve DMSO'dan daha düşük olması sayesinde kazandığı yüksek permeabilite ile etkisini göstermektedir. Gliserol, sitoplazmik membran üzerinde etkili olurken, EG hücre içindeki tüm membranı korumakta ve çözdürme esnasında oluşabilen ve hücrelerin şişip patlamasına neden olan ozmotik basınç değişimlerine neden olmamaktadır (15).

Genel olarak, yavaş dondurma yönteminde donma işleminin soğutma ve ısınma oranları gibi biyofiziksel özellikleri kontrol edilebilmekte ve kullanılan kriyoprotektanlarla istenmeyen hücresel olayların en aza indirilmesi sağlanabilmektedir. Bu yöntem, hücre içi buz kristal oluşumunu azaltarak ozmotik stresin zararlı etkilerini en aza indirmekte ve hücrelerin çok düşük sıcaklıklarda soğutulmasını sağlamaktadır (34).

*In vivo* olarak üretilen farklı gelişim dönemlerindeki koyun embriyolarının EG kullanılarak dondurulup çözdürülmesi sonrasında canlılık oranları erken morulalarda %40.5, geç morulalarda %46.3 ve blastosistlerde %87.3 olarak bildirilmiştir (8). Yapılan bir çalışmada, EG ve gliserolle yavaş metotla dondurulan koyun embriyolarının 72 saat inkübasyon sonrasındaki gelişim oranları; morula aşamasında sırasıyla %80; %60, blastosist aşamasında ise %71.4; %80 olarak tespit edilmiştir (24).

EG ile yavaş metotla dondurulan ve DMSO+EG kullanılarak vitrifikasyonla dondurulan keçi embriyolarının çözdürülerek transferinin taze transfer ile karşılaştırıldığı bir çalışmada embriyo yaşama oranları %25; %31.3 ve %35.7 olarak rapor edilmiştir (19). Yavaş dondurma yönteminde gliserol ve EG'nin farklarının değerlendirildiği başka bir çalışmada ise embriyoların 24. saatteki canlılık oranları sırasıyla %23.3 ve %62.5 olarak tespit edilmiştir (4). Yapılan bir diğer çalışmada, DMSO ve gliserolle yavaş metot kullanılarak dondurmanın canlılık üzerine etkileri karşılaştırılmış ve 24. saatte canlılık oranları DMSO'da %10.5 ve gliserolde %11.2 olarak belirlenmiştir (6).

Yapılan bu çalışmada dünyada olduğu gibi Türkiye'de de her geçen gün yaygınlaşan yüksek süt verimli Saanen keçilerinin popülasyonunu artırmak ve daha ileriki dönemlerde kullanılmak üzere embriyoların saklanabilmesi için kullanılacak yavaş embriyo dondurma yönteminin ve farklı kriyoprotektanların embriyo canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

*Hayvan materyali:* Projenin hayvan materyalini sağlıklı ve fertilesi bilinen, en az bir defa doğum yapmış, 2-3 yaş aralığında olan farklı ağırlıktaki (40-65 kg), 15 baş Saanen ırkı keçi ile aynı ırktan sağlıklı ve fertil 2-3 yaş aralığında olan üç baş teke oluşturdu. Keçiler aşım sezonu başlayana kadar Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde (38°1'12.3312" ve 32°30'52.2252") yaşam payı düzeyinde günde 2 kere kuru ve kesif yem ile beslendi. Çalışmanın Etik Kurul onayı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul'undan (2011/052) alındı.

*Senkronizasyon ve süperovulasyon:* Aşım sezonu içinde bulunan keçilerin en az bir defa siklus göstermeleri beklenip daha sonra herhangi bir zamanda 11 gün süreyle uygulanacak olan 20 mg fluorogeston asetat emdirilmiş intravaginal sünger (Chronogest CR® vaginal sünger, Intervet, İstanbul) yerleştirildi. Dokuzuncu gün sabah 0.165 mg PGF<sub>2</sub>α (Dalmazin®, enjektabl solüsyon, Vetaş, İstanbul) kas içi (IM) yolla uygulandı. Keçilere 3 gün sabah-akşam azalan dozlarda 200 mg (50-50; 30-30; 20-20 mg) FSH (Folltropin®, enjektabl solüsyon, Bioniche, Kanada) IM yolla uygulandı. Onikinci gün sabah 0.008 mg GnRH (Receptal®, enjektabl solüsyon, Intervet, İstanbul) IM yolla uygulanıp dört saat sonra gruplara teke katımı yapıldı. Her dişi bir teke ile çiftleştirilerek kaydı tutuldu. Akşam çiftleştirmeler tekrarlandı.

*Embriyoların toplanması:* Teke katımından sonraki 7. günde uterus'lar laparotomi yöntemiyle yıkanarak embriyolar toplandı (1, 28). Keçiler 0.22 mg/kg dozunda xylazin (im) (Rompun® %2, enjektabl solüsyon, Bayer, İstanbul) permedikasyonunu takiben ve 2 mg/kg dozunda ketamin hidroklorür (Ketasol %10, enjektabl solüsyon,

Richter pharma, İstanbul) (IM) ile anesteziye alındı. Operasyon seçim yeri meme lobunun cranial'inde kalan linea alba düzeyi olarak belirlendi ve aseptisi sağlandıktan sonra ensizyon ile karın boşluğuna girildi. Uterus bulundu ve ovarium'lar üzerindeki yapılar (corpora lutea ve follüküller) sayılarak ovarium bulguları not edildi. Foley kateteri (iki yollu, Rusch, no.10) uterus'un corpus bölgesindeki damarsız bir yerden küt olarak açılan delikten lümene sokuldu ve uterus cornu'larına sırasıyla yönlendirilerek yerleştirildi. Utero-tubal birleşim bölgesinden intravenöz kanül (IV kanül, 18 G, Bıçakçılar, Türkiye) ile girildikten sonra stilesi çıkartılıp buradan yıkama medyumunu [%1 fetal calf serum (FCS), (Sigma Aldrich F9665, USA)+medyum 199 (Sigma Aldrich M0650, Germany)] yavaş yavaş lümene verildi (36). Verilen yıkama vasatı steril 50 ml'lik konik tüplere foley kateteri ile geri alındı

Elde edilen yıkantı stereo mikroskopta tarandı ve morfolojik olarak incelenerek, International Embryo Technology Society (IETS) tarafından belirlenen kriterlere göre sınıflandırıldı (13). Sınıflandırma yapılırken embriyoların şekli, rengi, dejenerasyon oranı sitoplazmanın yapısı dikkate alındı. Hücre yapısında düzensizlik oranı az olan, yaşayan hücre oranı %50'nin üzerinde olan embriyolar dondurulmak üzere ayrıldı. Birinci ve ikinci kalitedeki embriyolar çalışmanın dondurma aşamasında kullanılmak üzere ayrı bir petride bulunan %20 FCS+M199 vasatına kondu.

*Embriyoların dondurulması ve çözündürülmesi:* Embriyolar EG, gliserol ve DMSO ile yavaş dondurma yöntemiyle dondurulmak üzere payetlendi (Agtech DT6300, USA). Payetler embriyo dondurma cihazı kullanılarak (Cryo cell 1200, Minitube, Austria), Liu (20) ve Seidel (33)'in belirttiği şekilde donduruldu ve çözündürme sonrası değerlendirilmeler yapılarak kadar sıvı azotta korundu. Her kriyoprotektan grubu için ortalama 30 embriyo kullanıldı. Dondurma işleminde kullanılan kriyoprotektan yoğunlukları ve işlemin süresi ile ilgili bilgiler Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Embriyo dondurma protokolü.  
Table 1. Embryo freezing protocol.

Grup	Kriyoprotektan	Yoğunluk ve Uygulama Süresi		
		1. Aşama	2. Aşama	3. Aşama
1	Etilen glikol	0,5 M/10dk	1 M/10dk	1,5 M/10dk
2	Gliserol	0,5 M/10dk	1 M/10dk	1,4 M/10dk
3	DMSO	%10/10dk	DPBS/ Yıkama	%10/ (Dondurma)

Çözündürme işleminden önce, %20 FCS + m-DPBS (Modified Dulbecco phosphate buffer solution) ve %20 FCS + 0.1 mM beta mercaptoethanol (βME)+TCM-199 vasatları hazırlandı ve petrielerin içine 100µl'lik küçük droplar (damlacık) yapıldı. Payetler sıvı azottan çıkartılıp

10 sn süreyle havada ve daha sonra 20 sn 37 °C'lik su banyosunda tutulduktan sonra içeriği petriye aktarıldı. Embriyolar stereo mikroskop altında %20 FCS+m-DPBS solüsyonunda 4 kez yıkandıktan sonra 38.5 °C'de 10 dk inkübatörde bekletildi. Daha sonra %20 FCS +0.1mM βME+TCM-199 (kültür vasatı) vasatında benzer bir şekilde 4 defa yıkandı ve aynı solüsyon içerisinde 38.5 °C'de CO<sub>2</sub> inkübatörde maksimum nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. Embriyo gelişimi 24 saat arayla takip edildi. Ölü embriyolar 1, yaşamaya devam eden embriyolar ise 2 olarak skorlandı.

Yapılan çalışma sonrasında embriyo canlılık oranları 24, 48 ve 72. saatler dikkate alınarak değerlendirildi. EG, gliserol ve DMSO'nun, embriyo gelişim dönemleri ve kalitelerinin embriyo canlılığı üzerine etkilerinin istatistik analizinde Ki-kare testi uygulandı. (Minitab 12.0 paket program). P<0.05 değeri istatistiki açıdan önemli kabul edildi.

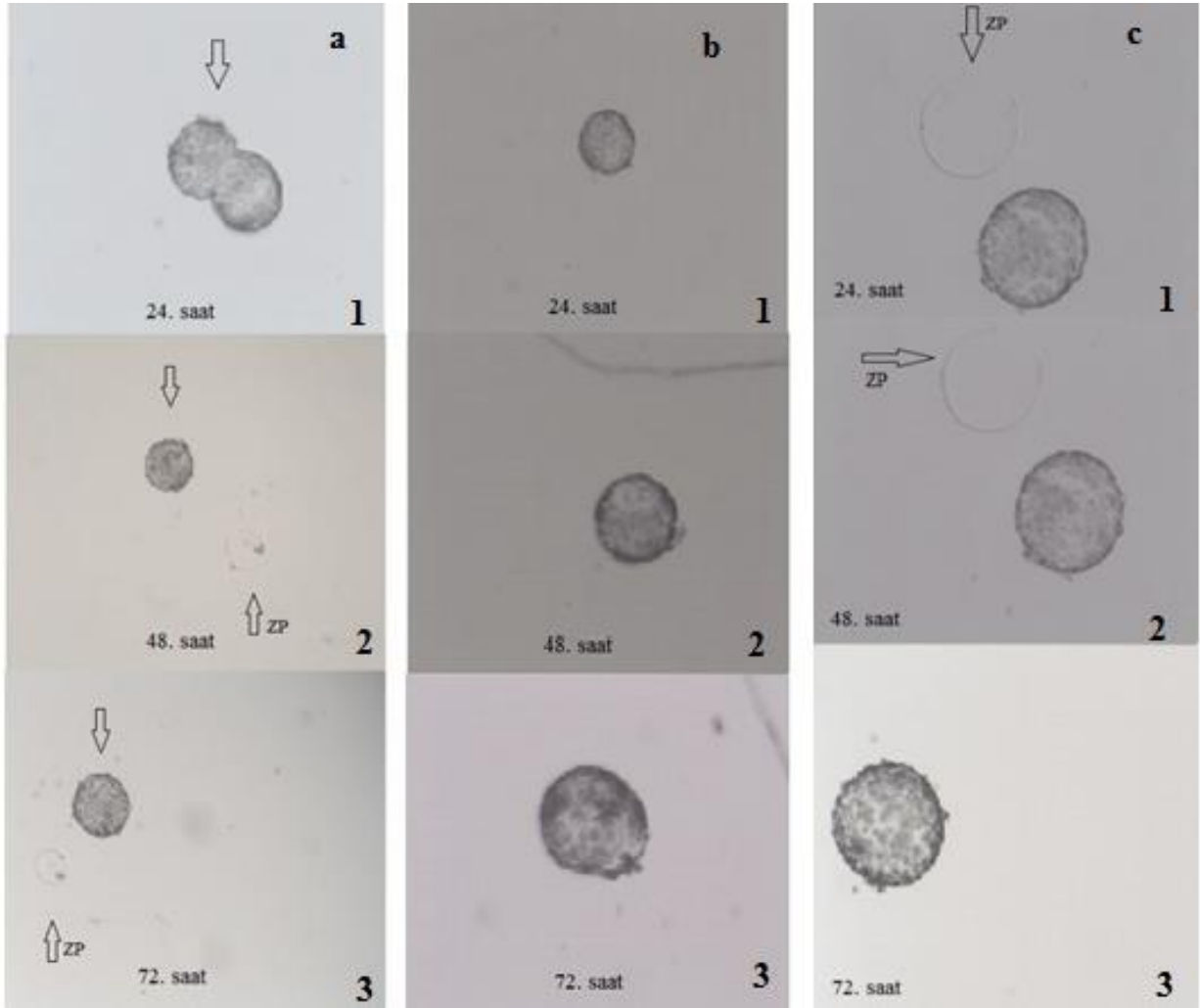
## Bulgular

Çalışmada 15 baş Saanen keçisinde uygulanan senkronizasyon ve süperovulasyon uygulamaları sonrasında; östrus görülme, süperovulasyon, embriyo toplama, erken luteal regresyon, fertilizasyon, transfer edilebilir embriyo ve transfer edilebilir nitelikteki embriyoların gelişim dönemlerine göre dağılım oranları Tablo 2'de sunulmuştur. Senkronizasyon protokolüne alınan hayvanların tamamı östrus gösterirken bu hayvanların %93.33'ünün süperovulasyona (≥4) cevap verdiği görülmüştür. Operasyonlar sonrasında embriyo toplama oranı %72.27 iken, transfer edilebilir embriyo oranı %84.13 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 2. Östrus görülme, süperovulasyon, embriyo toplama, erken luteal regresyon, fertilizasyon, transfer edilebilir embriyo ve gelişim dönemlerine göre embriyo dağılım oranları.  
Table 2. The rate of estrus, superovulation, embryo collection, early luteal regression, fertilization and transferable embryo.

Östrus görülme oranı (%)	100
Süperovulasyon oranı ( 4≥ Cl) (%)	93.33
Embriyo toplama oranı (%)	72.27
Erken luteal regresyon oranı (%)	26.67
Transfer edilebilir embriyo oranı (%)	84.13
Elde edilen toplam embriyo sayısı	100
Kompakt morula oranı (%)	34
Erken blastosist oranı (%)	20
Blastosist oranı (%)	36
Expanded blastosist oranı (%)	10

Elde edilen embriyoların farklı kriyoprotektanlar kullanılarak dondurulup çözündürülmesinin ardından 24, 48 ve 72. saatlerde (Şekil 1) yapılan canlılık muayeneleri sonucunda, 24 ve 48. saatler arasında istatistiki fark (P>0.05)



Şekil 1. (a, b ve c) 24, 48 ve 72. saatlerde embriyo gelişimi (80X).

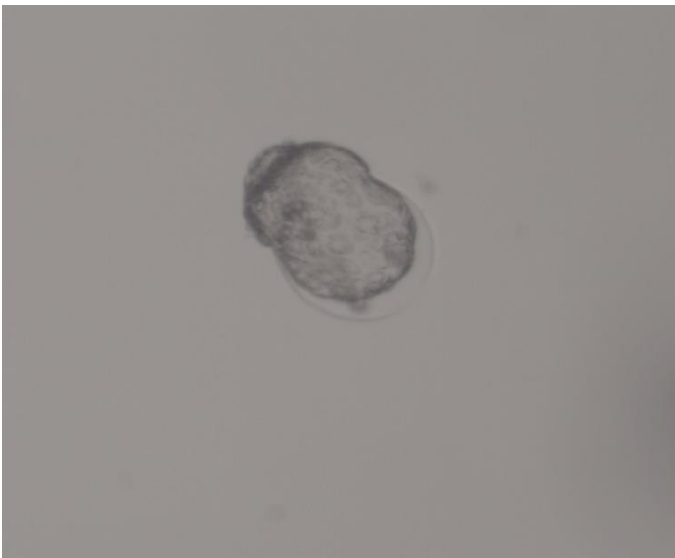
(a ve b) *hatching* blastosistler (a-1; b-3) ve *hatched* blastosistler (a-2; a-3).

(c) *Hatched* olan embriyonun gelişimine devam etmesi (ok: ZP: *Zona pellucida*). (Çizmeci SÜ, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, IVF Laboratuvarı, 2014).

Figure 1. (a, b and c) Embryo development at 24<sup>th</sup>, 48<sup>th</sup> and 72<sup>nd</sup> hours (80X).

(a and b) *hatching* blastocysts (a-1; b-3) and *hatched* blastocysts (a-2; a-3).

(c) development of the hatched embryo. (arrow: *Zona pellucida*). (Çizmeci SÜ, Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department Gynecology and Obstetrics, IVF Laboratory, 2014).



Şekil 2. EG ile dondurulan embriyonun çözündürme sonrası 72. saatteki görüntüsü, *hatching* blastosist (80X). (Çizmeci SÜ, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, IVF Laboratuvarı, 2014).

Figure 2. Image of EG frozen embryo at 72<sup>nd</sup> hour post-thaw, *hatching* blastocyst (80X). (Çizmeci SÜ, Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department Gynecology and Obstetrics, IVF Laboratory, 2014).

Tablo 3. 24, 48 ve 72. saatlerde embriyo, blastosist, morula, 1. ve 2. kalite embriyoların yaşama oranları.  
Table 3. Viability rate of embryo, blastocyst, morula, 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> quality of embryos at 24, 48 and 72<sup>nd</sup> hours.

Gelişim aşaması ve kalitesi	Zaman	EG	G	DMSO	P
Toplam embriyoların yaşama oranları	24. saat (%)	64.86	54.84	46.88	0.326537
	48. saat (%)	56.76	48.39	40.63	0.376659
	72. saat (%)	54.05 <sup>a</sup>	35.48 <sup>b</sup>	28.13 <sup>b</sup>	0.046951
Blastosistlerin yaşama oranları	24. saat (%)	76	54.55	42.11	0.066783
	48. saat (%)	64	45.45	36.84	0.177497
	72. saat (%)	60 <sup>a</sup>	36.36 <sup>ab</sup>	21.05 <sup>b</sup>	0.02936
Morulaların yaşama oranları	24. saat (%)	45.54	55.56	53.84	0.882996
	48. saat (%)	45.54	55.56	46.15	0.882996
	72. saat (%)	45.54	33.33	38.46	0.855377
1. kalite embriyoların yaşama oranları	24. saat (%)	77.27	68.42	56.52	0.312214
	48. saat (%)	68.18	61.11	47.83	0.357257
	72. saat (%)	63.64	47.36	34.78	0.126878
2. kalite embriyoların yaşama oranları	24. saat (%)	46.66	33.33	22.22	0.550576
	48. saat (%)	40	33.33	22.22	0.706293
	72. saat (%)	40	16.67	11.11	0.265399

a,b- Aynı satırda farklı harflerle belirtilen veriler arasında istatistiksel olarak belirgin fark vardır (P<0.05).

a,b- Different letters in the same line indicate a significant difference (P<0.05).

bulunmazken, 72. saatteki (Şekil 2) canlılık oranlarında etilen glikolle dondurulan embriyoların diğer kriyoprotektanlarla dondurulanlara oranla daha yüksek canlılık oranına sahip olduğu belirlendi (P<0.05) (Tablo 3).

Dondurulup çözdürülen embriyoların gelişim aşamalarına göre değerlendirilmesinde morulaların canlılık oranlarında grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır (P>0.05). Gliserolle dondurulan blastosistlerin 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlılık oranlarında gliserolün diğer kriyoprotektanlarla arasında fark bulunmazken, etilen glikol ile dondurulan blastosistlerin DMSO ile dondurulanlara nazaran 72. saatte daha yüksek canlılık oranına sahip olduğu belirlendi (P<0.05). Embriyoların kaliteleri göz önüne alındığında da grup içerisinde ve gruplar arasında istatistiksel fark tespit edilmemiştir (P>0.05) (Tablo 3).

### Tartışma ve Sonuç

Sunulan çalışmada üreme sezonunda yapılan senkronizasyon uygulamaları sonucunda tüm keçilerin östrus göstermesi geçmişte yapılan senkronizasyon çalışmalarıyla uyumluluk göstermiştir (16, 17, 18, 30, 31). Buna göre; uygulamada kullanılan intravaginal araç ve hormonların seçilen senkronizasyon protokolü için uygun olduğu kanısına varılmıştır.

Anöstrus döneminde Ankara ve Kilis keçileri üzerinde 0. gün protokolü uygulayarak yapılan bir çalışma sonucunda süperovulasyon cevaplarında (Ankara Keçisi: %88, Kilis Keçisi: %91) ırklar arasında istatistiksel fark bulunmadığı, ancak Ankara keçilerinin Kilis keçilerinden daha yüksek transfer edilebilir embriyo oranına sahip

olduğu bildirilmiştir (36). Yapılan bu çalışmada sezon içinde yapılan uygulama sonrasında %93.33 oranında süperovulasyon cevabı elde edilmiştir. Süperovulasyon uygulaması sonucunda alınacak cevap hayvandan hayvana değişmekte ve birçok faktörden etkilenmektedir. Bu nedenle süperovulasyon, embriyo transfer çalışmalarında başarıyı etkileyen en önemli faktörlerdendir (10, 21, 25, 26, 37). Literatürde de süperovulasyon cevapları arasında tam bir uyum belirlenememekle birlikte sunulan çalışmada süperovulasyon sonuçlarıyla diğer çalışmaların sonuçları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre keçileri ihtiyaçlarını karşılayacak düzeyde besleme ile yeterli ve uygun dozda FSH kullanımının etkili olduğu düşünülmüştür.

Güney Afrika'da Mayıs ayında yapılan ve yerli ırk keçilerle Boer keçilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada embriyo elde etme oranları sırasıyla %80 ve %94 olarak bildirilmiştir (10). Keçilerde FSH ve eCG ile süperovulasyon cevaplarının karşılaştırıldığı başka bir çalışmada FSH uygulanan hayvanlarda embriyo toplama oranı %65.5 iken eCG uygulanan hayvanlarda ise %81.5 olduğu rapor edilmiştir (22). Bu çalışmada ise embriyo elde etme oranı %72.27 olarak bulunmuştur. Buna göre embriyo elde etme oranı geçmişte yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermiştir. Progesteron içeren intravaginal sünger kullanılarak süperovulasyon uygulaması yapılan bir çalışmada transfer edilebilir embriyo oranının %96 olduğu bildirilmiştir (25). Sıfırıncı gün protokolü, CIDR/PGF<sub>2</sub>α/FSH ve CIDR/FSH kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise Grup1'de fertilizasyon cevabı oluşmadığı, Grup 2 ve 3 arasında transfer edilebilir embriyo oranlarında istatistiksel bir fark

olmadığı bildirilmiştir (19). Yapılan çalışmada ise embriyo kaliteleri ve gelişim dönemleri belirlendikten sonra transfer edilebilir embriyo oranı %84.13 olarak belirlenmiştir. Değerlendirilen literatür bilgileri ışığında transfer edilebilir nitelikteki (1. ve 2. kalite) embriyo oranlarının Quana ve ark. (29)'nın yaptığı çalışma ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Başarılı bir keçi süperovulasyon programında, donör başına ortalama 6-8 transfer edilebilir embriyo üretilebilir. Bununla birlikte, cins, yaş ve beslenme gibi birçok faktör transfer edilebilir embriyo oranlarını etkileyebilmektedir. Donörler'den %25-50 oranında fertilizasyon yetersizliği ve erken luteal regresyon şekillenmesi nedeniyle embriyo üretilememektedir (28).

Yapılan bir çalışmada, tohumlama sonrası 7. günde elde edilen 24 embriyonun %54.16'sinin kompakt morula, %12.50'sinin erken blastosist, %8.33'ünün blastosist, %20.83'ünün *expanded* blastosist ve %4.17'sinin *hatched* blastosist olduğu bildirilmiştir (11). Embriyo toplama işlemi genellikle aşım/tohumlama sonrası 7. günde yapılır ve bu günde embriyolar kompakt morula ile *expanded* blastosist aşamaları arasında bulunabilir (9, 10, 35, 39). Bu çalışmada da elde edilen transfer edilebilir nitelikteki embriyoların gelişim aşamalarının yukarıda bildirilen literatürlerle paralellik gösterdiği tespit edilmiş ve uygulanan operasyon tekniği ve zamanlamasının Saanen keçileri için uygun bir metot olduğu kanısına varılmıştır. Türkiye'deki yerli ırklarda yapılan araştırmalarda, operasyonların 7. günde yapılması sonucunda daha fazla embriyo kaybının gözlemlendiği ve 6.5 günde yapılan operasyonların daha başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (1, 36). Elde edilen bulgular eşliğinde Saanen keçilerinde benzer bir durumla karşılaşılmamıştır.

Etilen glikol, gliserol ve DMSO kullanılarak yavaş metotla dondurulan embriyoların çözündürme sonrası *in vitro* kültürdeki 24 ve 48 saatlerde canlılık oranlarında grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Ancak 72. saatte etilen glikolle dondurulan embriyoların canlılık oranlarının diğer kriyoprotektanlarla dondurulanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Diğer çalışmalarla uyumlu olarak embriyo canlılık oranlarının embriyonun inkübasyonda kaldığı süre arttıkça buna paralel olarak olumsuz etkilendiği görülmüştür. Literatürde de belirtildiği gibi embriyoların canlılık oranlarının EG'de, diğer kriyoprotektanlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (4). DMSO'nun molekül ağırlığının diğer kriyoprotektanlardan yüksek olması nedeniyle daha az koruyucu etkinliğe sahip olduğu, gliserolün ise 24. saate kadar daha iyi bir koruma sağladığı ancak 24. saatten sonra canlılığın hızla düştüğü belirlenmiştir. Gliserolle dondurulan embriyolar 24 saat inkübasyon sonrası transfer edilirse başarı oranının daha yüksek olduğu düşünülmüştür.

Etilen glikol ve gliserol kullanılarak yavaş metotla dondurulan embriyoların çözündürme sonrası gelişmelerinin

değerlendirildiği bir çalışmada EG ile dondurulup çözdürülen morulaların gelişimi %23 iken, blastosistlerin gelişiminin %45 olduğu, gliserol kullanılan embriyolarda ise morulaların %0, blastosistlerin ise %35 oranında yaşadığı bildirilmiştir (7). Keçi embriyolarının EG kullanılarak yavaş metotla ve vitrifikasyonla dondurulmasının ardından transferi sonucunda blastosistlerin yaşama oranları %42 ve %70 iken, *hatched* blastosistlerinki ise %19 ve %13 olarak tespit edilmiştir (2). Başka bir çalışmada ise EG kullanılarak yavaş dondurulan keçi embriyolarının gliserolle vitrifiye edilen embriyolarla karşılaştırıldığında transfer sonrasında embriyo canlılıkları morulalarda sırasıyla %43; %66.6 ve blastosistlerde ise %50; %77.4 olduğu rapor edilmiştir (23). Sunulan çalışmada dondurulup çözdürülen embriyoların gelişim aşamaları değerlendirildiğinde morulalarda grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Blastosistlerin değerlendirilmesinde gliserolle dondurulan embriyoların canlılık oranlarında diğer kriyoprotektanlarla bir fark bulunmazken, EG ile DMSO arasında 72. saatteki canlılık oranlarında fark olduğu ( $P<0.05$ ) ve etilen glikolün daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Etilen glikol ile dondurulan embriyolarda diğer çalışmalarla (5, 24) uyumlu olarak blastosistlerin yaşama oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Embriyonun gelişim dönemi ve dolayısıyla yaşı ilerledikçe yaşama oranı artmaktadır (8, 15). DMSO ve gliserol gruplarındaki bu farklılığın kaliteden de etkilenmiş olabileceği ve istatistiksel fark görülmemesi nedeniyle göz ardı edilebileceği düşünülmüştür. Embriyo kaliteleri değerlendirildiğinde grup içerisinde istatistiksel fark belirlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Birinci kalite embriyoların yaşama oranlarının bütün kriyoprotektan gruplarında 2. kalite embriyolarından daha yüksek bulunduğu ve diğer çalışmalarla (12, 38) benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Embriyo kalitesi dondurma başarısını etkileyen önemli bir faktördür. Kalite derecelendirmesinde çok iyi ve iyi olarak sınıflandırılan embriyolarda yaşayan hücre oranı fazladır. İkinci kalite embriyolarda yaşayan hücre oranı %50 kadarken 3. kalite embriyolarda %25'ler seviyesindedir. Aynı zamanda blastomerlerin büyüklük yoğunluk ve renginde de düzensizlikler mevcuttur. Yaşayan hücre oranının düşük olması ve dejenerasyon oranının yüksek olması embriyonun yaşama oranını düşürmektedir (15).

Sunulan çalışmada yapılan uygulamalar sonucunda yavaş dondurma yöntemi ile her üç kriyoprotektanın da embriyo canlılığı üzerinde farklı oranlarda koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür. Ancak EG kullanılan embriyolarda inkübasyon zamanları, embriyo gelişme dönemi ve embriyonun kalitesi yönünden diğer kriyoprotektanlara nazaran 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlılık oranlarında daha başarılı olduğu görülmüştür. Özellikle 72. saate ulaşmada en başarılı sonucun EG ile alındığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak embriyoların canlılıklarını etkileyen birçok faktör olması göz önüne alındığında *in vivo* olarak

üretilen kaliteli Saanen ırkı keçi embriyolarının yavaş yöntemle dondurulması sırasında kriyoprotektan olarak en iyi sonucun EG ile alındığı ve daha sonraki çalışmalarda ya da embriyo transferi amacıyla ticari olarak başarıyla kullanılabilceği kanaatine varılmıştır.

### Kaynaklar

1. **Ağaoğlu AR, Karakaş K, Kaymaz M** (2014): *In vivo embryo production in some native goats breeds in Turkey*. Turk J Vet Anim Sci, **38**, 1-7.
2. **Al Yacoub AN, Gaulty M, Holtz W** (2010): *Open pulled straw vitrification of goat embryos at various stages of development*. Theriogenology, **73**, 1018-1023.
3. **Amiridis GS, Cseh S** (2012): *Assisted reproductive technologies in the management of small ruminants*. Anim Reprod Sci, **130**, 152-161.
4. **Cocero MJ, Procureur E, De La Fuente J ve ark.** (1988): *Glycerol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos*. Theriogenology, **29**, 238.
5. **De Paz P, Sanchez AJ, Fernandez JG ve ark.** (1994): *Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing*. Theriogenology, **42**, 327-338.
6. **Frank GC, Coley SL, Betterbed B ve ark.** (1985): *The effects of cryoprotective agents, dilution rates, freezing rates, and freezing units on the survival of bovine embryos*. Theriogenology, **23**, 194.
7. **Gal FL, Baril G, Vallet JC ve ark.** (1993): *In vivo and in vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol*. Theriogenology, **40**, 771-777.
8. **Garcia-Garcia RM, Gonzales-Bulnes A, Dominquez V ve ark.** (2006): *Survival of frozen thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages*. Cryobiology, **52**, 108-113.
9. **Gordon I** (1997): *Reproduction in sheep and goats*. CABI publishing, USA.
10. **Greyling JPC, ven der Nest M, Schwalbach LMJ ve ark.** (2002): *Superovulation and embryo transfer in South African Boer and Indigenous feral goats*. Small Ruminant Res, **43**, 54-51.
10. **Grizelj J, Vince S, Tomaskoviç A ve ark.** (2006): *Superovulation response and embryo recovery of donor does Boer race in embryo transfer procedures*. 14 Congreso Internacional de la Federacion Mediterranea de Sanidad y Produccion de Rumiantes.
11. **Han YM, Kim SJ, Park JS ve ark.** (2000): *Blastocysts viability and generation of transgenic cattle following freezing of in vitro produced, DNA-injected embryos*. Anim Reprod Sci, **63**, 53-63.
12. **International Embryo Transfer Society (IETS)**. Available at <http://www.iets.org/index.asp?autotry=true&ULnotkn=true> (Accessed 03.04.2011).
13. **Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N** (1995): *Manual of Bovine Embryo Transfer*. National Livestock Breeding Center MAFF JICA- JAPAN.
14. **Kaymaz M** (2012): *Yardımcı Üreme Teknikleri*, 695-811. In: A Semacan, M Kaymaz, M Fındık, A Rışvanlı, A Köker (Ed). Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji, Medipress, Malatya.
15. **Kılboz Eİ, Karaca F** (2010): *Üreme mevsimi dışında genç keçilerde flugeston asetat vaginal sünger ve norgestomet kulak implantı uygulamalarıyla östrüslerin uyarılması*. Van Vet J, **21**, 1-6.
16. **Lehloenya KC, Greyling JPC, Grobler S** (2008): *Effect of season on the superovulatory response in Boer goat does*. Small Ruminant Res, **78**, 74-79.
17. **Lehloenya KC, Greyling JPC** (2010a): *The ovarian response and embryo recovery rate in Boer goat does following different superovulation protocols, during the breeding season*. Small Ruminant Res, **88**, 38-43.
18. **Lehloenya KC, Greyling JPC** (2010b): *Embryo transfer using cryopreserved boer goats blastocysts*. S Afr J Anim Sci, **5**, 446-450.
19. **Liu L** (2009): *Development of novel cryopreservation method for mammalian oocytes*. Szent Istvan University. Available at [www.szie.hu/file/tti/archivum/Jun\\_Liu\\_ert.pdf](http://www.szie.hu/file/tti/archivum/Jun_Liu_ert.pdf) (Accessed 10.05.2011).
20. **Mapletoft RJ, Kristina BS, Gregg PA** (2002): *Recent advances in the superovulation in cattle*. Reprod Nutr Dev, **42**, 601-611.
21. **Maracek I, Krajnicakova M, Kostecky M ve ark.** (2002): *Tertiary follicular growth wave dynamics after oestrus synchronization and superovulation in ewes and goats*. Acta Vet Brno, **71**, 481-486.
22. **Martemucci G, D'Alessandro AG** (2013): *Efficiency of FSH/LH treatments for in vivo production of embryos and their cryopreservation by different methods in goats*. Small Ruminant Res, **114**, 264-271.
23. **Martinez AG, Matkoviç M** (1998): *Cryopreservation of ovine embryos: Slow freezing and vitrification*. Theriogenology, **49**, 1039-1049.
24. **Mayorga I, Maraa L, Sannaa D ve ark.** (2011): *Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices*. Theriogenology, **75**, 1661-1668.
25. **Menchaca A, Vilarino M, Crispo M ve ark.** (2007): *Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats*. Theriogenology, **68**, 1111-1117.
26. **Palasz AT, Mapletoft RJ** (1996): *Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances*. Biotech Adv, **14**, 127-149.
27. **Paramio MT** (2010): *In vivo and in vitro embryo production in goats*. Small Ruminant Res, **89**, 144-148.
28. **Prentice JR, Anzar M** (2011): *Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics*. Veterinary Medicine International, **1-11**. Available at <http://dx.doi.org/10.4061/2011/146405> (Accessed 13.03.2014).
29. **Quana F, Zhang Z, Anc Z ve ark.** (2010): *Effect of transporting donor or recipient does and their embryos on the outcome of fresh embryo transfer in Boer goats*. Small Ruminant Res, **88**, 1-5.
30. **Sağırkaya H, Bağış H** (2003): *Memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu*. Uludağ Üniv Vet Fak Derg, **22**, 127-135.
31. **Sarıbay MK, Doğruer G, Ergün Y ve ark.** (2008): *Üreme sezonu dışında laktasyondaki kıl keçilerinde flourogestone acetat içeren vaginal süngerlerle östrüslerin uyarılması; GnRH ve hCG uygulamalarının döl verimi üzerine etkisi*. Vet Bil Derg, **24**, 21-27.
32. **Seidel GE** (1991): *Training manual for embryo transfer in cattle*. Food and agriculture organization of the united

- nations (FAO), Rome, [Cited 11.03.2014]. Available at <http://www.fao.org/docrep/004/t0117e/t0117e00.htm>.
33. **Smith GD, Silva CA, Silva E** (2004): *Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos*. *Reprod BioMed Online*, **9**, 171-178.
  34. **Stringfellow DA** (2010): *Recommendations for the sanitary handling of in vivo derived embryos*, 65-68. In: DA Stringfellow, MD Givens (Ed), *Manual of the international embryo transfer society* (International Embryo Transfer Society), IETS publishing, United States of America.
  35. **Taşdemir U, Ağaoglu AR, Kaymaz M ve ark.** (2011): *Ovarian response and embryo yield of Angora and Kilis goats given the day 0 protocol for superovulation in the non-breeding season*. *Trop Anim Health Prod*, **43**, 1035-1038.
  36. **Tekeli T** (2010): *Embriyo Nakli*, 81-97. In: E Alaçam (Ed), *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*, Medisan, Ankara.
  37. **Van Wagendonk-De Leeuw AM, Den Daas JHG, Kruij TH ve ark.** (1995): *Comparison of the efficacy of conventional slow freezing rapid cryopreservation methods for bovine embryos*. *Cryobiology*, **32**, 157-167.
  38. **Wright JM, Appendix D** (2010): *Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes*, 141-144. In: DA Stringfellow, MD Givens (Ed), *Manual of the international embryo transfer society* (International Embryo Transfer Society), IETS publishing, United States of America.
  39. **Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF ve ark.** (1994): *Developmental potential of in vitro produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer*. *Theriogenology*, **42**, 1275-1284.

Geliş tarihi: 10.11.2016 / Kabul tarihi: 05.04.2017

**Yazışma adresi:**

Sakine Ülküm ÇİZMECI  
Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı,  
Selçuklu, Konya, Türkiye.  
e-mail: [ulkum@selcuk.edu.tr](mailto:ulkum@selcuk.edu.tr).