

SİĞİR OVUMLARININ İN VİTRO FERTİLİZASYONU

Sema USTA¹

In Vitro fertilization of Bovine Oocytes.

SUMMARY

In this study, in vitro maturation, fertilization and culture of bovine ova were investigated. To collect ova, ovaries from slaughtered cows were transported to the laboratory in PBS in a vacuum flask. The ovaries were sliced with a razor blade and the liberated follicular contents were rinsed with 0.9% NaCl + 1% FCS (Fetal Calf Serum) into a watch glass. Flushing fluids were examined under stereo microscope. Oocytes were selected and then matured for 24 hours in a Modified Menezo's Medium (MMM). At the end of this period, matured ova were transferred into fertilization medium (Modified Tyrode-Lactat Medium), and spermatozoa treated with swim-up procedure were introduced in for 20 hours. After incubation, one-cell presumptive zygotes were transferred into culture medium (MMM) for seven days. On day 5, oocytes attached to the granulosa cell monolayer were detached by smooth pipetting. On day 7, all of the embryos and non-fertilized oocytes were fixed in ethanol:acetic acid (3:1) for 24 hours and then stained with orcein for microscopic evaluation.

In the present study, 88 ova were recovered, and after 7 days in in vitro culture period, a total of 66 fertilized embryos (4 one-cell, seven 2-cell, twenty 4-cell, twenty-eight 8-cell, three 16-cell, three compacted morulae and 1 blastocyst) were obtained.

KEY WORDS: Bovine, in vitro fertilization.

GİRİŞ

İlk defa 1890 yılında Heape tarafından bir tavşandan elde edilen embrioların diğer bir tavşana nakledilmesi ile başlayan embrio transferi ve bununla ilgili çalışmaların, son 30-40 yıl içerisinde büyük aşamalar kaydettiği görülmektedir. Bununla beraber, Türkiye'de gerek bu konu ile ilgili altyapının istenen düzeyde oluşturulamaması, gerekse süperovulasyon ve senkronizasyonda kullanılan hormonların yüksek maliyeti gibi etkenler nedeniyle, embrio transferine gereken önem verilememiştir.

Memeli ovumunun in vitro fertilizasyonu (in vitro olgunlaştırılması, in vitro fertilizasyonu ve fertilizasyonu sağlanmış ovumların in vitro kültürü) konusuna duyulan ilgi ise çok daha yenidir (5, 12, 20). Ülkemizde, tavşan ve fare gibi laboratuvar hayvanlarında in vitro kültür ve fertilizasyon konusunda çeşitli çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, siğir ovumlarının in vitro olgunlaştırılması, fertilizasyonu ve fertilizasyon sonrasında elde edilen embrioların kültürü ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır (7, 8, 16). Embriyo transferi ve bilimsel amaçlı çalışmalar için, in vitro fertilizasyon (IVF) teknikleri kullanılarak, süperovulasyona gerek kalmadan, fazla sayıda ovum veya embrio elde edilebileceği bilinmektedir. Özellikle insan hekimliğinde büyük ilgi gören IVF çalışmaları sonucunda, 1978 yılında ilk bebek doğmuş ve bu güne kadar 20.000'den fazla doğum gerçekleştirilmiştir (2, 5, 20). Hayvanlarda ise ilk buzağının doğduğu

ÖZET

Bu çalışma, siğir ovumlarının in vitro olarak olgunlaştırılması, fertilizasyonu, fertilizasyonu sağlanmış ovumların in vitro kültürü ve daha sonraki gelişme aşamaları üzerinde yapıldı. Bu amaçla, mezbahada kesilen ineklerin ovaryumları, ovumların elde edilmesi amacıyla, PBS solüsyonu içerisinde laboratuvara getirildi. Ovaryumların dış yüzeyi bistüri ile çeşitli yönlerde kesildi ve % 0.9 NaCl + % 1 FCS (Föetal Buzağı Serum) solüsyonu ile bir saat camı içerisine yıkandı. Toplanan yıkama sıvıları stereo mikroskop altında incelendi. Elde edilen ovumlar, in vitro olgunlaştırma vasatı (Modifiye edilmiş Menezo Medyum) içerisinde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, olgunlaşmasını tamamlayan ovumlar, fertilizasyon vasatına (Modifiye edilmiş Tyrode-laktat) aktarıldı ve üzerine swim-up işlemi ile hazırlanmış spermatozoidler ilave edildi. Ovum ve spermatozoidler birarada 20 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda fertilize olduğu kabul edilen ovumlar kültür vasatına (Modifiye edilmiş Menezo) aktarılarak 7 gün süreyle kültüre edildi. Kültürün 5. günü fertilize ovumlar, pastör pipeti vasatıyla uygun olarak kumulus hücre kitlesinden ayrıldı. Fertilize olmamış ovum ve embrioların tamamı 7. gün kültür vasatından alınarak, 3:1 oranında alkol:asetik asit ile 24 saat boyunca fixe edildi ve bu sürenin sonunda, orcein ile boyanarak gelişmeleri değerlendirildi.

Çalışmada elde edilen 88 ovuma IVF aşamaları uygulandı. 7 günlük kültür periyodunun sonunda 4 adet tek hücreli (zigot), 7 adet 2 hücreli, 20 adet 4 hücreli, 28 adet 8 hücreli, 3 adet 16 hücreli, 3 adet kompakt morula ve 1 adet erken blastosist gelişim dönemindeki embriolar elde edildi. Sonuç olarak, 66 ovumun fertilize olduğu saptandı (% 75.00).

ANAHTAR KELİMELER: İnek, in vitro fertilizasyon.

1981'den sonraki yıllarda siğir endüstrisinde ticari amaçla kullanılmasının yanında, memeli fertilizasyonu ve gelişmenin erken dönemlerinin açıklanmasında, reproduktif ve genetik ilerlemenin aşama kaydetmesinde bilimsel bir öneme sahip olan IVF çalışmaları, sonuçlar açısından hala istenilen başarıya ulaşamamıştır (2, 3, 5, 11, 12, 13, 19, 20).

Siğirlerde IVF araştırmaları için ovaryumlar genellikle mezbahadan elde edilmektedir (3, 5, 6, 9, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22). Ovumların elde edilmesi için değişik yöntemler bulunmaktadır. En çok kullanılan yöntemlerden biri, ovaryum yüzeyindeki folliküllere (özellikle 1-8 mm çapındaki) kanül ile girilerek follikül sıvısının aspire edilmesidir (3, 9, 14, 15, 18). Diğer bir yöntem ise, ovaryum yüzeyinin bistüri ile kesilerek bu yüzeyin uygun bir vasatla yıkanmasıdır (19, 21, 22). Toplanan follikül veya yıkama sıvıları, stereo mikroskop altında incelenerek ovumlar toplanmakta ve olgunlaştırma vasatı içerisinde 20-28 saat süre ile inkübasyona bırakılmaktadır (3, 6, 9, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21). En az 2-3 sıra kumulus hücre tabakasına sahip olan ovumlar, in vitro olgunlaştırma için uygun olarak kabul edilmektedir (3, 14, 18, 19, 21, 22). Olgunlaşan ovumların üzerine, spermatozoidler ilave edilerek yaklaşık 16-22 saat bir arada tutulmaktadır (14, 18, 19, 22). Bu sürenin sonunda fertilize oldukları düşünülen ovumlar, kültür vasatına alınarak kültüre edilmektedir.

Fertilizasyonun kanıtı olarak şu kriterler göz önüne alınmaktadır (4, 14, 17, 18, 20).

- Ooplazma içerisine spermatozoid penetrasyonu,
- Sperm başının şişmesi,
- Pronukleus oluşumu,

1: İ.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, 34851, Avcılar-İstanbul.

- d) Morfolojik olarak normal bölünme aşamaları (cleavage),
- e) Blastosist oluşumu,
- f) Embrioda y kromozomunun görülmesi,
- g) Kortikal granüllerin yıkılmanması,
- h) Ooplasma içerisinde spermazoid kuyruğunun görülmesi.

Parthenogenetik embriolarda da bu bulgulardan bazıları görülebildiği için, belirtilen kriterlerin çoğu tek başına normal fertilizasyonun yeterli kanıtı sayılamamaktadır (4, 11). Başarılı bir IVF'nun tartışmasız tek kanıtının yavrunun doğumu olduğu kabul edilmektedir (11, 18).

MATERYAL ve METOD:

Çalışma, Hannover Veteriner Fakültesi, Reprodüksiyon Enstitüsü Laboratuvarında 3 aşamada gerçekleştirildi.

1- Ovumların elde edilmesi ve olgunlaştırılması: Bu amaçla, Almanya'nın Hannover kenti yakınlarındaki Gleidingen mezbahasında kesilen ineklerden elde edilen 16 adet ovaryum kullanıldı. Ovaryumlar, içinde yaklaşık 30 °C ısıda PBS bulunan termos ile laboratuvara getirildi. Herbir ovaryumun yüzeyi bistüri yardımıyla çeşitli yönlerde kesildi ve bu kısımlar % 0.9 NaCl + % 1 FCS ile yıkanarak yıkantının bir saat camı içerisinde toplanması sağlandı. Daha sonra, stereo mikroskop altında yıkama sıvısı incelenerek ovumlar elde edildi ve olgunlaştırma vasatına aktarılarak 39 °C ısı, % 5 CO₂ ve % 100 nemli inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Olgunlaştırma

Tablo 1. Modifiye Edilmiş Menezo B₂ Medyumu.

Madde	mg/100 ml	Madde	mg/100 ml
Tween 80	5.0	KH ₂ PO ₄	6
Cholesterin	12.5	Na-acetat	5
NaCl	525	Ca-(lactat) ₂	50
NaHCO ₃	250	Vitamin C	5
KCl	80	Penicillin	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	20	Streptomycin	4
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	15.4	Phenolred	2

Tablo 2. Modifiye Edilmiş Tyrode-Lactat Medyumu.

Madde	mg/100 ml	Madde	mg/100 ml
NaCl	666	CaCl ₂	30
KCl	23.5	MgCl ₂	10
NaHCO ₃	210.4	Lactat-sirup % 60	186µ
Na ₂ HPO ₄	4.3	Phenolred	1

Tablo 3. İn Vitro Fertilizasyonu Takiben Kültürdeki 7. Günün Sonunda Saptanan Gelişme Dönemleri.

	Kullanılan Ovum	Fertilize olmayan Ovum	F e r t i l i z e O v u m						
			Tek Hücreli	2 Hücreli	4 Hücreli	8 Hücreli	16 Hücreli	Kompact Marula	Erken Blastosis
Adet	88	22	4	7	20	28	3	3	1
%	100	25	6.06	10.6	30.30	42.42	4.54	4.54	1.51
						70.45			
							75		

vasatı olarak modifiye edilmiş Menezo'nun medyumu (MMM) kullanıldı (Tablo 1). Vasata ayrıca Na-Piruvat, glukoz, amino asitler ve vitamin solüsyonu eklendi. Bunların dışında da % 10 oranında ECS (Estrus Cow Serum, Östrustaki İnek Serumu) ve FSH ilave edildi.

2- Ovumların fertilizasyonu: Fertilizasyon işleminden yaklaşık 1.5 saat önce, spermanın hazırlanması amacıyla, dondurulmuş-eritilmiş boğa spermasına swim-up işlemi uygulandı. Bu işlem için payetlerin eritilmesini takiben, 90-180 µl miktarında sperma, içerisinde vasat bulunan tüplerin dip kısımlarına yavaşça bırakıldı. Swim-up işleminde de Na-Piruvat, HEPES, BSA (Bovine Serum Albumin), amino asitler ve vitamin ilaveli MMM vasatı (Tablo 1) kullanıldı. Tüpler 45° eğim verilerek 39 °C ısıdaki inkübatörde 1 saat boyunca inkübe edildi. Bu süre sonunda, tüplerin üst kısmındaki motil spermatozoidleri içeren medyum toplanarak 1000 devirde 10 dakika santrifüje edildi. Üst kısım atıldıktan sonra üzerine taze medyum ilave edildi ve tekrar 10 dakikalık santrifüje kondu. Bu işlemi takiben, üst kısımdaki vasat atıldı ve yaklaşık 20-30 ovum içeren her bir bölmeye 10 µl işleme tabi tutulmuş spermatozoid içeren süspansiyon (yaklaşık olarak 400.000 spermazoid) ilave edilerek, ovumlar ile spermazoidlerin 20 saat süreyle inkübe edilmeleri sağlandı. Fertilizasyon vasatı olarak, modifiye edilmiş Tyrode-Laktat vasatı kullanıldı (Tablo 2). Bu vasatada ayrıca Na-Piruvat, BSA, heparin ve PHE (Penicillamine, Hypotaurine ve Epinephrine) ilave edildi.

3- Fertilize ovumların kültürü: Spermatozoidlerle inkübasyonu takiben fertilize oldukları kabul edilen ovumlar, fertilizasyon vasatından kültür vasatına (Tablo 1) aktarıldı ve 7 gün süreyle kültüre edildi. Kültür vasatına Na-Piruvat, glukoz, amino asitler ve vitamin dışında ayrıca % 10 oranında ECS ilave edildi. Embriolar, kültür vasatına aktarıldıktan sonraki 5. günde, kumulus kütlesinden ayrıldı.

Değerlendirme amacıyla, 7 günlük kültür süresinin sonunda embrioların (ve fertilize olmamış ovumların) tümü alkol:asetik asid karışımında (3:1) 24 saat süreyle fikse edildi. Daha sonra, orcein ile boyanarak 400x büyütme ışık mikroskopunda incelendi.

BULGULAR

Ovaryumların yıkanması sonunda, toplam olarak 88 adet ovum elde edildi. İn vitro fertilizasyona tabi tutulan bu ovumlardan 7 günlük kültür periyodunun sonunda 4 adet tek hücreli, 7 adet 2 hücreli, 20 adet 4 hücreli, 28 adet 8 hücreli, 3 adet 16 hücreli, 3 adet morula ve 1 adet erken blastosist gelişim dönemindeki embriolar elde edildi. İn vitro fertilizasyonu takiben elde edilen embrioların gelişme dönemleri ve fertilize olmayan ovum sayıları Tablo 3'de yer almaktadır. İki pronukleusa sahip ovumlar fertilize olarak (tek hücreli) kabul edilirken, blastomer sayısı 40 ve 60 adetten fazla olan embriolar sırasıyla, kompakt morula ve erken blastosist dönemi olarak değerlendirildi.

Çalışmada, fertilizasyon oranı % 75 olarak gerçekleşti. Bölünme aşamasındaki embrio (cleavage) oranının ise % 70.47 olduğu saptandı.

Fertilize olmuş ovuların, kompakt morula ve blastosiste gelişme oranları ise sırasıyla % 4.54 ve % 1.51 olarak belirlendi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde oldukça önem kazanan in vitro fertilizasyon ile ilgili olarak gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda, % 75.00 fertilizasyon ve % 70.47 bölünme aşamasındaki embrio (cleavage) oranları elde edilmiştir. Bu oranlar, Susko-Parrish ve ark.(15)'nin saptadıkları oranlardan düşük, fakat diğer bazı araştırmacıların (6, 13, 14) verilerinden ise daha yüksek gerçekleşmiştir.

Sunulan çalışmada, yüksek bir fertilizasyon ve bölünme aşamasındaki embrio (cleavage) oranları elde edilmesine rağmen, fertilizasyonu takip eden kültür periyodunda embrioların % 42.42'sinin 8 hücreliden daha ileri aşamalara gelişemediği dikkati çekmiştir. Siğir embriosunda en önemli aşamanın, fonksiyonel kontrolün embrionik genlere geçtiği 8 hücreli gelişme dönemi olduğu, bu değişimlerin in vitro çalışmalarda gelişme blokları şeklinde ortaya çıktığı, tam olarak belirlenememiş bazı faktörlerin bu dönemde embriolar için gerekli olduğu ve çeşitli ko-kültür sistemleri sayesinde belirtilen blokların aşılabilceği araştırmacılarca ifade edilmiştir (1, 20).

Scodras ve ark.(10), in vitro fertilizasyon ile ilgili çalışmalarında, in vitro fertilizasyonla beraber değişik hücrelerle embrioların ko-kültürünü denemeler, çalışmaları sonucunda embrioların kompakt morula ve blastosistlere gelişme oranlarını sırasıyla % 2.9-20.0 ve % 2.9-27.6 arasında bulmuşlardır. Aynı şekilde, siğir ovidukt epitel hücreleri ile zigotları ko-kültüre eden Semple ve ark.(13), blastosiste gelişme oranlarını % 41.1±7.7 olarak bildirmektedirler. Her iki araştırmada elde edilen veriler, ko-kültür uygulanmayan bu çalışmadaki oranların oldukça üzerindedir.

Gerek bilimsel, gerekse hayvan ıslahı açısından çok değerli olan in vitro fertilizasyon çalışmalarının gelişebilmesi ve başarının artırılması için çok sayıda araştırmaya gereksinim duyulmaktadır. Özellikle, ko-kültür sistemlerinin geliştirilmesi, in vitro blokların aşılmasını kolaylaştırarak transfer edilebilir embrioların oranını artırmada yararlı olacaktır kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Betteridge KJ, Flechon JE (1988) The Anatomy and Physiology of the Pre-Attachment Bovine Embryos, *Theriogenology*, 29 (1) 155-187.
2. Biggers JD (1981) In vitro fertilization and embryo transfer in human beings, *The New England Journal of Medicine*, 304, 336-342.
3. Brackett BG, Zuelke KA (1993) Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos, *Theriogenology*, 39, 43-64.
4. Hafez ESE (1987) *Reproduction in Farm Animals*. 5th Edition Lea and Febiger. Philadelphia.
5. Leibo SP, Loskutoff NM (1993) Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos, *Theriogenology*, 39, 81-94.
6. Miller GF, Giliedt DL, Lester TD, Pierson JN, Rakes JM, Rorie RW (1992) Addition of bovine oviductal epithelial cells (BOEC) and/or penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) to bovine in vitro fertilization (IVF) medium increases the subsequent embryo cleavage rate, *Theriogenology*, 37, 1, 259.
7. Özkoca A, İleri İK, Ahmad M, Pabuççuoğlu S, Usta S (1992) Tavşan embriolarının in vitro kültüründe farklı siğir serumu konsantrasyonlarının etkileri. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, 2. Ulusal Nükleer Tarım ve Hayvancılık Kongresi (Tebliğ Özeti) 25-27 Kasım, Ankara.
8. Pabuççuoğlu S, İleri İK (1994) PMSG'nin iki farklı uygulaması ile kazanılan tavşan embriolarının değişik vasatlarda In Vitro kültürleri ve transferleri, *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 18, 53-58.
9. Sanbushho A (1989) Influence of serum and gonadotropins on in vitro bovine oocyte maturation and fertilization, *Diss. Abstr. Int. B., Sciences and Engineering*, 49, 8, 3046.
10. Scodras JM, Pollard JW, Betteridge KJ (1991) *Theriogenology*, 35, 1, 269.
11. Seidel GE (1986) *Genetik engineering In: Current Therapy in Theriogenology*, Ed. Morrow, DA, WB Saunders Company, Philadelphia, 88-92.
12. Seidel GE Jr (1991) Embryo transfer: The next 100 years, *Theriogenology*, 35 (1) 171-180.
13. Semple E, Loskutoff N, Leibo SP, Betteridge KJ (1993) Effects of culture medium and maturation time on in-vitro development of bovine oocytes into blastocysts, *Theriogenology*, 39, 307.
14. Stubbings RB, Liptrap RM, Betteridge KJ, Walton JS, Armstrong DT, Basur PK (1990) Requirements for bovine oocyte maturation in vitro, *Reprod. Dom. Anim.*, 25, 158-166.
15. Susko-Parrish J, Aktas H, Leibfried-Rudledge ML (1992) The effect of energy substrates during maturation on the fertilization and development of bovine oocytes, *Theriogenology*, 37, 1, 305.
16. Tekeli T (1984) Investigations on in Vitro Fertilization of Rabbit Ova, *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 31 (2) 186-196.
17. Xu KP, Greve T (1988) A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes, *J. Reprod. Fert.*, 82, 127-134.
18. Xu KP, Greve T, Callesen H, Hyttel P (1987) Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro, *J.Reprod.Fert.*, 81, 501-504.
19. Xu KP, Hill B, Betteridge KJ (1992) Application of in vitro fertilization technique to obtain calves from valuable cows after slaughter, *The veterinary Record*, 130, 204-206.
20. Xu KP, King WA (1990) The biology of mammalian fertilization and embryo development, *Ag. Biotech News and Information*, 2 (1) 25-28.
21. Xu KP, Yadav BR, King WA, Betteridge KJ (1992) Sex related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro, *Molecular Reproduction and Development*, 31, 249-252.
22. Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ, King WA (1992) Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells, *J. Reprod. Fert.*, 94, 33-43.