

İn Vitro Fertilizasyonla Elde Edilen Koyun Embriyolarının Blastosist Dönemine Kadar Geliştirilmesi*

Sema BİRLER, Serhat PABUÇÇUOĞLU, Serhat ALKAN, Özen Banu ÖZDAŞ,
Hatem ATALLA, İrfan Kamuran İLERİ
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 27.04.2001

Özet: Koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılması, fertilizasyonu ve elde edilen embriyoların blastosist dönemine kadar geliştirilmesi hedeflenen bu çalışmada, mezbahada kesilen Kıvırcık ırkı koyunların ovaryumları kullanılmıştır. Ovaryumlar 30-35 °C ısıda PBS solüsyonu içerisinde laboratuvara getirilmiş ve follüküllerin açılıp, oosit yıkama medyumu ile yıkanmasıyla kumulus-oosit kompleksleri elde edilmiştir. Stereo mikroskop altında seçilen kumulus-oosit kompleksleri sodyum piruvat, follükül stimulan hormon (FSH), luteinizan hormon (LH) ve % 10 fetal buzağı serumu (FCS) ilaveli medyum-199 içerisinde, 38.5 °C ısı ve % 5 CO₂'li ortamda 23-24 saat olgunlaştırılmıştır. Üç adet Kıvırcık ırkı koçtan alınan ve pooling yapılan taze sperma, Percoll yöntemi ile in vitro fertilizasyon amacıyla hazırlanmış ve % 2 SES (östrustaki koyun serumu) ilaveli BSOF medyumu içine alınan oositlerin üzerine ilave edilerek (0.8x10⁶ spermatozoon/ml) 20-21 saat inkübe edilmiştir. Fertilize edilen oositler sentetik ovidukt medyumu (SOF) içerisine alınmış ve % 5 CO₂, % 5 O₂ ve % 90 N₂'lu gaz karışımı bulunan ortamda 8. güne kadar kültüre edilmiştir. Kültürdeki 4. gün oositlerin bulunduğu medyuma 1.5mM glikoz ilave edilmiştir.

Çalışmada kullanılan 171 oositin 151 tanesi yarıklanmış (% 88,3), bunlardan 56 tanesi morula (% 37,1), 14 tanesi ise (% 9,3) blastosist dönemine ulaşmıştır.

Anahtar Sözcükler: Koyun, in vitro fertilizasyon, in vitro kültür, blastosist dönemine gelişim

Development of In Vitro Derived Sheep Embryos to the Blastocyst Stage

Abstract: The objective of the present study was to mature and fertilize primary sheep oocytes in vitro and to develop them to the blastocyst stage. Ovaries from slaughtered Kıvırcık ewes were used. The ovaries were transported to the laboratory in a vacuum flask in which 30-35 °C PBS (phosphate buffered saline) was included. The cumulus-oocyte complexes were collected by rupturing and washing the follicle wall with oocyte washing medium. They were then selected under a stereo microscope and matured for 23-24 hours in medium 199 supplemented with sodium pyruvate, follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and 10% fetal calf serum (FCS), under 5% CO₂ atmosphere and at 38.5 °C temperature. Semen collected and pooled from three Kıvırcık rams by electro-ejaculation and prepared for in vitro fertilization by Percoll-gradient method was incubated for 20-21 hours with oocytes in BSOF medium supplemented with 2% sheep estrous serum (SES) (0.8x10⁶ spermatozoon/ml). Presumptive zygotes were cultured in SOF medium for 8 days in synthetic oviduct medium (SOF) under an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. Glucose (1.5mM) was added to the culture medium on Day 4.

Out of 171 oocytes, 151 cleaved (88.3%). Fifty-six morulae (37.1%) and 14 blastocysts (9.3%) were obtained from these in vitro derived embryos.

Key Words: Sheep, in vitro fertilization, in vitro culture, development to blastocyst stage

Giriş

Hayvan ıslahının hızlandırılması ve genetik ilerleme amacıyla günümüzde kullanılan biyoteknolojik yöntemler ile oldukça önemli ilerlemeler kaydedilmektedir.

Ülkemiz şartlarında bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda [koyun (1-3), inek (4-6), laboratuvar

hayvanları (7)] istenen düzeye ulaşamamıştır. Dünyada bu konuda yapılan birçok çalışmada (8-13) % 6-40 oranında blastosist oranları bildirilirken, ülkemizde koyunlarda yapılan önceki çalışmalarda (1-2) in vitro fertilizasyon ve kültür sonrası blastosist dönemine ulaşmak mümkün olmamıştır.

*Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No: 1288/050599

Bu çalışmanın amacı, primer koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılması, in vitro fertilizasyonu ve in vitro kültürünü takiben blastosist dönemine ulaşılmasıdır.

Materyal ve Metot

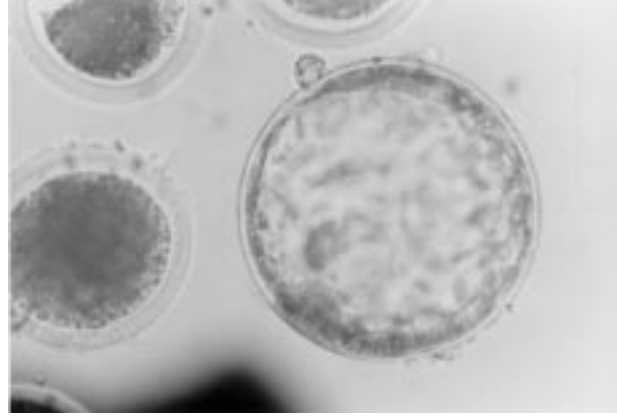
Oositlerin kazanılması ve olgunlaştırılması: Çalışmada oosit kazanımı amacıyla Çekmece Et kombinasi (Hadımköy-İstanbul) mezbahasında kesilen Kıvrıkcık ırkı koyunların ovaryumları kullanıldı. Ovaryumlar, içinde 30-35 °C ısıdaki fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) bulunan termos içerisinde laboratuvara getirildi. PBS solüsyonunda tekrar yıkanan ovaryumlar oosit kazanımı süresince bu solüsyonun içerisinde su banyosunda tutuldu. Ovaryumların yüzeyindeki 1-6 mm. çapındaki antral folliküller açılarak, follikül içleri Hapes tamponlu medyum 199 (H-199+) ile bir saat camına yıkandı. Yıkantı sıvıları stereo mikroskop altında incelenerek en az 4 sıra kompakt kumulus kitlesi olan homojen vitellusa sahip oositler olgunlaştırma amacıyla seçildi. Bu oositler H-199+ medyumunda 3 kez yıkandıktan sonra olgunlaşma medyumunda (FSH, LH, sodyum piruvat ve FCS ilaveli M 199) içerisine transfer edildi. Medyumun üzeri mineral yağ ile örtüldü ve oositler 38.5 °C ısı, % 5 CO₂'li ortamda 23-24 saat inkübe edildi. İlk kesimden itibaren ovaryumlardan oositlerin kazanılması ve kültüre konmasına kadar geçen sürenin 5 saatten fazla olmamasına özen gösterildi.

Spermanın hazırlanması ve in vitro fertilizasyon: Üç Kıvrıkcık ırkı koçtan elektro- ejakülatör yöntemiyle alınan sperma pooling yapılarak, oda ısısına gelmesi beklendi ve hapes tamponlu sentetik ovidukt sıvısı medyumunda (HSOF) ile sulandırıldı (1:20; sperma:medyum). İki tabaka halinde hazırlanan Percoll'ün (% 90 ve % 45) üzerine bir tabaka halinde 200 µl sulandırılmış sperma bırakıldı ve 1500 g'de 15 dakika santrifüje edildi. Üst kısmın tamamen atılmasından sonra dipteki pellet HSOF ile tekrar sulandırıldı ve 600 g'de 6 dakika daha santrifüje edildi. Üst kısmın tamamen atılmasından sonra spermanın konsantrasyon tayini yapıldı.

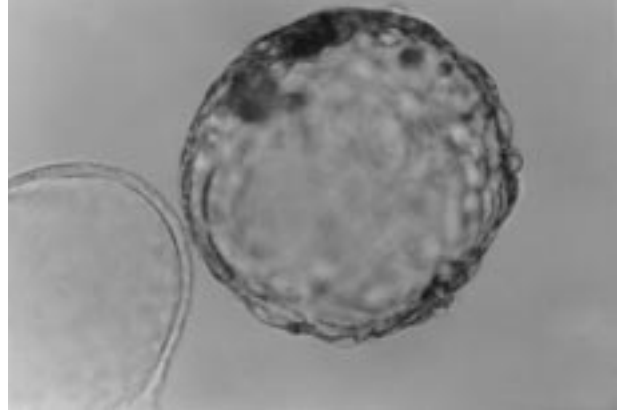
İn vitro olgunlaştırmayı takiben oositler hafifçe pipetlenerek kumulus hücrelerinin bir kısmı uzaklaştırıldı ve iki kez H-199+ medyumunda yıkandıktan sonra % 2 oranında SES (östrustaki koyunlardan elde edilen serum) ilaveli, bikarbonat tamponlu SOF (BSOF) medyumunda içerisine alındı. Hazırlanmış sperma oositler üzerine ilave

edildi (0.8x10⁶ spermatozoon/ml) ve 38.5 °C ısı, % 5 CO₂'li ortamda 20-21 saat inkübasyona bırakıldı.

İn vitro kültür: Spermatozoonlarla inkübasyonu takiben fertilize oldukları düşünülen oositler iki kez HSOF ve bir kez SOF medyumunda ile hafifçe pipetlenerek yıkandı ve SOF medyumunda içerisine alındı. Fertilize olmuş oositler, 38.5 °C ısı ve % 5 O₂, % 5 CO₂ ve % 90 azot gaz karışımı sağlanan ortamda kültüre edildi (7-8 gün). Kültürdeki 4. gün medyuma 1.5 mM glikoz ilave edildi ve bölünmeyen oositler kültür medyumundan uzaklaştırıldı. Kültür süresinin sonunda embriyoların gelişmeleri değerlendirildi (Şekil 1-2).



Şekil 1. Expanded (genişlemiş) blastosist döneminde bir koyun embriyosu.



Şekil 2. Hatched blastosist dönemine (zona pellucidadan çıkmış) ulaşmış bir koyun embriyosu.

Bulgular

Çalışmada 171 oosit in vitro olgunlaştırma, fertilizasyon ve kültür amacıyla kullanıldı, bunlardan 151 tanesi (% 88,3) yarıklanma (cleavage) geçirdi. Sonuçlar Tablo 1'de yer almaktadır.

Oosit sayısı	Yarıklanmış oosit sayısı (%)	Yarıklanmış oositlere göre	
		Morula sayısı (%)	Blastosist sayısı (%)
171	151 (88,3)	56 (37,1)	14 (9,3)

Tablo 1. Koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılması, fertilizasyonu ve 8 günlük kültürü sonucu ulaşılan gelişme dönemleri.

Tartışma

Bu çalışmanın sonuçları, mezbahada kesilen koyunların oositleri ile in vitro olgunlaştırma, in vitro fertilizasyon ve in vitro kültür aşamalarını takiben transfer edilebilir kalitede embriyolara dünya standartlarına yakın ölçüde ulaşılabilirdiğini göstermektedir. Sunulan çalışmada yarıklanma (cleavage) oranı oldukça yüksek (% 88,3) olmuştur. Naqvi ve ark. (14) ile Walker ve ark. (15) sırasıyla % 29-51 ve % 50-70 yarıklanma oranları bildirirlerken, daha önce yaptığımız çalışmalarda (1-2) da % 13-62 ve % 33-53 yarıklanma oranları elde edilmiştir. Gomez ve ark. (8) ile Sevellano ve ark. (9) % 62-70 oranlarında yarıklanma saptamışlardır. Bu çalışmada elde edilen yarıklanma oranı, bildirilen oranların üzerinde iken, O'Brien ve ark. (10)'nın saptadıkları yarıklanma oranlarına (% 81-82) benzerdir.

İn vitro olarak üretilmiş (in vitro fertilizasyon aşamaları uygulandıktan sonra yarıklanmış olan) embriyoların morula ve blastosist dönemine ulaşma oranları günümüzde halen düşük düzeydedir. Özellikle blastosist dönemine ulaşma oranları, bu yolla elde edilmiş embriyoların daha ileri yaşama ve yavru oluşturma kabiliyetlerinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden yapılan çalışmalarda morula ve özellikle blastosist dönemine ulaşan embriyo sayıları artırılmaya

çalışılmaktadır. Sunulan çalışmada elde edilen morula oranı (% 37,1) birçok araştırmacı tarafından elde edilen verilerden yüksek iken [16 (% 16-21); 11 (% 15-18); 12 (% 14-18)], Madan ve ark. (17)'nin bildirdikleri morula oranlarına (% 37,6) benzer olmuştur. Buna karşın Czlonkowska ve ark. (18) ile Sevellano ve ark. (9) daha yüksek morula oranları (sırasıyla % 43 ve % 56,3) bildirmişlerdir.

Çalışmada ulaşılan blastosist oranları ise bazı araştırmacılar (8,10,11,12) tarafından bildirilen oranlardan düşük olmasına rağmen, Sevellano ve ark. (9) ile O'Brien ve ark. (13)'nin sunduğu verilere (sırasıyla % 6-11 ve % 13) yakın olmuştur. Daha önce yaptığımız çalışmalarda (1-2) olduğu gibi, diğer bazı araştırmacılar da (14,16,17) oldukça düşük (% 0-7) blastosist oranları bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, mezbahada kesilen koyunların ovaryumlarından elde edilen primer oositlerin in vitro olgunlaştırılması, fertilizasyonu ve kültürünü takiben blastosist dönemine ulaşılmış olması, bu tekniklerin standardize edildiğini göstermektedir. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar daha ileri araştırmalar için önemli bir basamak oluşturmaktadır. Devamı olarak da öncelikle in vitro fertilizasyon ile elde edilen embriyoların transferi ve bu şekilde in vitro üretilen embriyoların in vivo yaşama ve yavru oluşturma güçleri incelenecektir.

Kaynaklar

- Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Alkan, S., Evecen, M., İleri, İ.K.: Effects of serum and hormone additives in maturation media and co-culture with sheep oviductal epithelial cells (SOEC) on in vitro fertilization of sheep oocytes. Society for the Study of Fertility, Annual Conference. 1999; 4-7 July, Aberystwyth-England.
- Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Alkan, S., Ak, K., Evecen, M., İleri, İ.K.: Effects of different maturation and culture media on in vitro fertilization of sheep oocytes. The Second International Alpha Congress. 1999; 16-19 September, Copenhagen-Denmark.
- Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Ak, K., Alkan, S., Evecen, M., Öztürkler, Y., İleri, İ.K.: Effects on in vitro maturation of sheep oocytes of serum and hormone additions to maturation medium. J. Fac. Vet. Univ. Istanbul. 1999; 25 (1): 75-79.
- Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Alkan, S., Evecen, M., İleri, İ.K.: Sığır oositlerinin in vitro fertilizasyonu üzerine farklı medyumların ve bu medyumlara yapılan hormon ilavelerinin etkileri. İstanbul Üniv. Vet.Fak.Derg. 1997; 23 (2): 511-516
- Birler, S., Pabuççuoğlu, S., İleri, İ.K., Alkan, S., Evecen, M.: Sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında farklı sürelerin etkisi. TÜBİTAK, Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 1998; 22, 551-557.
- Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Alkan, S., Evecen, M., İleri, İ.K.: İn vitro fertilize edilen sığır oositlerindeki pronüklear gelişim üzerine olgunlaştırma ve fertilizasyon sürelerinin etkisi. TÜBİTAK, Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 1998; 22, 1-15.
- Tekeli, T., Güler, M., Aksoy, M.: Fare ovumlarının in vitro fertilizasyonu üzerinde çalışmalar. S.Ü. Vet. Fak. Derg. 1991; 6 (1): 13-15.

8. Gomez, M.C., Catt, J.W., Evans, G., Maxwell, W.M.C.: Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *Theriogenology*. 1998; 49, 1143-1154.
9. Sevillano, C., Anel, L., De La Fuente, J., Alvarez, M., Celorrio, I., De Paz, P., Boixo, J.C., Olmedo, J.A.: In vitro development of sheep embryos derived of repeated laparoscopic folliculoaspiration. *Theriogenology*. 1997; 47, 298 (Abstr.)
10. O'Brien, J.K., Catt, S.L., Ireland, K.A., Maxwell, W.M.C., Evans, G.: In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology*. 1997; 47, 1433-1443.
11. Holm, P., Walker, S.K., Petersen, B.A., Ashman, R.J., Seamark, R.F.: In vitro vs in vivo culture of ovine IVM-IVF ova: effect on lambing. *Theriogenology*. 1994; 41, 217 (Abstr.).
12. Holm, P., Walker, S.K., Seamark, R.F.: Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or vivo. *J. Reprod. Fert.* 1996; 107, 175-181.
13. O'Brien, J.K., Rhodes, S.L., Maxwell, W.M.C., Evans, G.: Hormonal requirements for in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*. 1994; 41, 266 (Abstr.).
14. Naqvi, S.M.K., Madan, M.L., Manik, R.S., Chauhan, M.S., Singla, S.K.: In vitro development of ovine oocytes matured and fertilized in vitro to compact morula in co-culture system of oviductal cells and conditioned medium. *12th Int. Cong. on Anim. Reprod.* 1992; 3, 1327-1329.
15. Walker, S.K., Hill, J.L., Bee, C.A., Warnes, D.M.: Improving the rate of production of sheep embryos using in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*. 1994; 41, 330 (Abstr.).
16. Byrd, S.R., Flores-Foxworth, G., Applewhite, A.A., Westhusin, M.E.: In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology*. 1997; 47, 857-864.
17. Madan, M.L., Naqvi, S.M.K., Chauhan, M.S., Singla, S.K., Manik, R.S.: In vitro production of ovine preimplantation embryos from in vitro matured oocytes using epididymal and frozen thawed spermatozoa. *12th Int. Cong. on Anim.Reprod.* 1992; 3, 1318-1320.
18. Czlonkowska, M., Eysymont, U., Guskiewicz, A., Kossakowski, M., Dziak, J.: Birth of lambs after in vitro maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. *Mol. Reprod. Dev.* 1991; 30, 34-38.