

In Vitro Fertilize Edilen Sığır Oositlerindeki Pronüklear Gelişim Üzerine Olgunlaştırma ve Fertilizasyon Sürelerinin Etkisi*

Sema BİRLER, Serhat PABUÇÇUOĞLU, Serhat ALKAN, Mithat EVECEN, İ. Kamuran İLERİ
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Avcılar-İstanbul-TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 12 / 2 / 1997

Özet: Mezbahada kesilen ineklerin ovaryumlarından kazanılan primer oositler (n=520) 3 gruba ayrılarak, %5 O₂, %5 CO₂ ve %90 N₂ gaz karışımı altında, %95-100 nem ve 39°C ısı şartlarında 22, 24 ve 26 saat süresince olgunlaştırıldı. Olgunlaştırma medyumu olarak FSH ve %20 ECS ilaveli modifiye Parker medyumu (MPM) kullanıldı. Üç ayrı grupta olgunlaştırılan oositler (22 saat=122, 24 saat=143 ve 26 saat=255) BSA, heparin, PHE ilaveli Tyrode-laktat medyumu içerisine alındı. Payetlerde dondurulmuş boğa sperması eritildikten sonra yüzdürme (swim-up) işlemi uygulanarak oositlerin üzerlerine (10µl±400.000 spermatozoon/30-35 oosit) ilave edildi. İnkübasyon sırasında, 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saatler sonunda oositler fikse edilerek boyandı ve faz-kontrast mikroskop altında incelendi.

Olgunlaşma gruplarına göre toplam 42 (%72.4), 38 (%69.1) ve 100 (%84.7) oositte erkek ve dişi pronükleusların senkronize olduğu saptandı. 26 saatlik grup ile diğer gruplar arasındaki fark çok ileri düzeyde anlamlı bulundu (χ^2 , p<0.001). Senkronize pronükleuslara sahip olan oositlerin, olgunlaşma gruplarına göre sırasıyla 25 (%59.5), 29 (%76.3) ve 74 (%74.0) tanesinde pronükleusların 4 veya 5. evreye ulaştığı görüldü. 22 saatlik gruptaki düşük oran diğer gruplara göre çok ileri düzeyde (χ^2 , p<0.001), 24 saatlik gruptaki yüksek oran ise 26 saatlik gruba göre ileri düzeyde anlamlı bulundu (χ^2 , p<0.01). Olgunlaşma süreleri dikkate alınmadan toplam 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saatlik fertilizasyon sürelerindeki senkronize oosit oranları sırasıyla %65.0, 73.0, 87.9, 71.9, 78.9 ve 87.7 olarak gerçekleşti. Senkronize 4 ve 5. dönemlere ulaşmış pronükleuslara sahip ovum oranları fertilizasyondan 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saat sonra sırasıyla %50.0, 66.7, 62.1, 65.4, 83.3 ve 81.4 olarak saptandı. Çalışmada elde edilen bu oranların fertilizasyon süresi arttıkça yükseldiği gözlemlendi ve 14. saat ile 22 ve 24. saatler arasındaki farklar ileri düzeyde anlamlı bulundu (p<0.01).

Bu verilere göre, sığır oositlerinin 24 veya 26 saat olgunlaştırılması gerektiği, pronükleuslara uygulanacak gen transferi gibi mikromanipulasyon işlemlerinin ise in vitro olgunlaştırılmış oositlerin spermatozoonlarla birarada bırakılmalarından itibaren en erken 20 saat sonra gerçekleştirilebileceği görüşü ağırlık kazanmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Sığır, oosit, in-vitro olgunlaştırma, in-vitro fertilizasyon, pronüklear senkronizasyon

Effects of Maturation and Fertilization Times on Pronuclear Development of Bovine Oocytes Fertilized in Vitro

Abstract: Primer oocytes (n=520) collected from ovaries of slaughtered cows were divided into 3 groups, and matured at 39°C with 95-100% humidity and under a gas mixture of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ for 22, 24 and 26 hours. Modified Parker's Medium (MPM) supplemented with FSH and 20% ECS was used as maturation medium. At the end of these periods, oocytes (22 h.=122, 24 h.=143 and 26 h.=255) were taken into Tyrode-lactate medium supplemented with BSA, heparin and PHE, and frozen-thawed bull semen was add after swim-up procedure (10µl±400.000 spermatozoa/30-35 oocytes). Oocytes matured in 3 groups were kept with spermatozoa for 14, 16, 18, 20, 22 and 24 hours. At the end of these time periods all oocytes were fixed, stained and examined by phase-contrast microscope.

In total 42 (72.4%), 38 (69.1%) and 100 (84.7%) oocytes relating to the maturation groups, male and female pronuclei were synchronised. Difference between the 26 h. group and the other groups was highly significant (χ^2 , p<0.001). In 25 (59.5%), 29 (76.3%) and 74 (74.0%) oocytes, pronuclei were reached the 4th and 5th stages, respectively, according to the maturation groups. The low rate in 22 h. group was highly significant relating to the other groups (χ^2 , p<0.001), and the high rate in 24 h. group was significantly important relating to the 26 h. group (χ^2 , p<0.01). In all maturation groups, relating to 14, 16, 18, 20, 22 and 26-hours fertilization periods, synchronous ova rates were 65.0, 73.0, 87.9, 71.9, 78.9 and 87.7%, respectively and

(*) Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir Proje No: 720/260495

synchronous ova developed to the 4th or 5th stages of pronuclei were 50.0, 66.7, 62.1, 65.4, 83.3 and 81.4%, respectively.

According to these results we concluded that cattle oocytes must be matured for 24 or 26 hours, and after incubation with spermatozoa, can be used not earlier than 20 hours for micromanipulation procedures into pronuclei (e.g. gene transfer).

Key Words: Bovine, oocyte, in-vitro maturation, in-vitro fertilization, pronuclear synchronization

Giriş

Mikromanipulasyon yardımıyla pronüklear dönemdeki embriyoların pronükleuslarına önceden hazırlanmış belirli bir genin verilmesi ile transgenik hayvan elde edilmesine yönelik çalışmalar deney hayvanları bazında ülkemizde de başlatılmıştır (1). Çiftlik hayvanlarında özellikle sığırlarda in vivo olarak pronüklear dönemdeki embriyoları elde etmek çok güç ve oldukça fazla masraf gerektiren bir işlem olmasına rağmen in vitro fertilizasyon (in vitro olgunlaştırma, fertilizasyon ve kültür) teknikleri sayesinde mezbaha materyalinden çok sayıda pronüklear dönemdeki embriyo elde etme olanağı vardır.

Birçok araştırmacı (2,3,4,5,6), in vitro fertilizasyon amacıyla sığır oositlerini 24 saat olgunlaştırmayı uygun bulmaktadır. Semple ve ark. (7) ise, olgunlaşmanın 14. saatinde oositlerin gelişme yeteneğini kazandıklarını ve erken fertilize edilen oositlerin, blastosist dönemine ulaşma oranının daha yüksek olacağını öne sürmüşlerdir. Sığır oositlerinin 16 saat olgunlaştırılmasını takiben, 20 saat spermatozoonlarla birarada bırakan van der Westerlaken ve ark. (8)'nin bildirdiği fertilizasyon oranları da (%55.7-64.5) kısa süre olgunlaşmanın yeterli olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, germinal vezikül (GV) dönemindeki sığır oositlerini fertilize eden Abeydeera ve ark. (9) bu durumda polispermimin çok yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Nakagawa ve ark. (10), olgunlaşma süresi arttıkça (≥ 28 saat) asenkranöz pronükleus gelişiminin yükseldiğini ve bu durumun embriyodaki daha ileri dönemlerde gözlenecek anormal gelişimin göstergesi olduğunu öne sürmüşlerdir.

Spermatozoonun oosit içerisine girmesi, ikinci mayotik bölünmenin tamamlanmasını ve 2. polar cismin atılmasını teşvik etmektedir. Bunu takiben kompakt olan spermatozoon nükleusu genişlemekte (dekondenzasyon) ve DNA sentezi yapabilecek yetenekteki erkek pronükleusa transforme olmaktadır. Spermatozoon başının dekondenzasyonu; var olan nükleus zarının yıkılması, sıkıca paketlenmiş kromatinin dekondenzasyonu ve yeni bir zar oluşumunu kapsamaktadır. Spermatozoon ve oosit pronükleuslarının gelişme mekanizmaları hakkındaki bilgiler çok az olmasına rağmen, oositlerin penetrasyonunu takiben sitoplazmik değişim-

ler ve erkek pronükleusun gelişmesini teşvik eden nüklear faktör veya faktörlerin GVBD-germinal vezikül yıkılması (GV-Brakedown) ile salındığı tahmin edilmektedir. Erkek pronükleusun gelişmesinde meydana gelen olayların zamanlaması tam olarak belirlenememiştir, fakat DNA sentezi için pronükleus zarının oluşması ve spermatozoon pronükleusunun olgunlaşmasının gerekli olduğu açıklanmıştır. Kubisch ve ark. (11), in vitro fertilizasyondan 22 saat sonra pronükleusların maksimum oranda görülebildiğini ve gen transferi amacıyla bu saatteki ovumların kullanıldığını bildirmişlerdir. Pronüklear oluşumun başlangıç dönemleri ovumun kortikal bölgesinde gerçekleşmektedir. Mayotik bölünme ve 2. polar cismin atılması fertilizasyondan hemen önce tamamlandığı için, başlangıçta ovumun pronükleusu da periferal olarak lokalize olmuştur. İlk yarıklanmadan (cleavage) kısa süre önce her iki pronükleus ovumun merkezine doğru ilerlemekte, pronüklear zarlar yok olmakta ve her iki kromatin birbirine karışmaktadır. Paternal ve maternal kromatinlerin karışması ile (singami), fertilizasyon işlemi tamamlanmaktadır. Normal fertilizasyonun kanıtı olarak, oosit içerisinde iki pronükleus ve genellikle bir spermatozoon kuyruğunun görülmesi sayılmaktadır. (3,12,13,14,15,16)

In vitro fertilizasyon için ortama katılan spermatozoon konsantrasyonunun öncelikle polispermik fertilizasyon üzerine etkili olduğunu ve olgunlaşma süresine bağlı olarak polispermik fertilizasyonun arttığını bildiren Long ve ark. (17), spermatozoon konsantrasyonunun ve spermatozoon-oosit inkübasyon süresinin ayarlanmasıyla polispermi oranının azalabileceğini açıklamışlar, fakat olgunlaşma süresinin artması ile yükselen polispermi oranının kortikal granül ekzositozisinin eksikliğine bağlı olmadığını belirtmişlerdir.

Erkek ve dişi pronükleusların (PN) gelişmesini 6 döneme ayıran Xu ve Greve (18), bu pronükleusların gelişme dönemlerinin her zaman eş zamanlı olmadığını bildirmişlerdir. Kapasite olmuş spermatozoonların kumululus katmanları ile zona pellusidaya penetre olması ve sonuçta oolemma ile kaynaşmasına kadar geçen zaman tam olarak bilinmemesine rağmen, bu olaylar için gereken minimum sürenin 6 saatten daha az olduğu sonucuna varmışlardır. Araştırmacılar (18), spermatozoon başı dekondenzasyonunun (pronükleus 1'den Pro-

nükleus 3'e) penetrasyondan sonraki 1-2 saat içinde meydana geldiğini ve dekondeze kromatinin sonraki pronükleer dönemlere (pronükleus 3'ten pronükleus 6'ya) gelişmesi için ise 4-6 saat gerektiğini bildirmişlerdir. Rehman ve ark. (6), in vivo olarak sığır oositlerinin fertilizasyon anında çok az spermatozoon ile karşılaştığını ve penetrasyonun ovulasyondan sonraki 2 saat içerisinde meydana geldiğini belirtmektedirler. Araştırmacılar (6), az miktar medyum içerisinde nispeten fazla sayıda spermatozoon ile inkübe edilen oositlerin, in vitro fertilizasyon esnasında hidrolitik enzimlere maruz kaldığını ve bu durumun oositler üzerinde zararlı etkisinin olabileceğini bildirmişler ve maksimum fertilizasyon oranının elde edilebileceği, minimum inkübasyon süresinin arzu edilir olduğunu belirtmişlerdir.

Fertilizasyonu takiben, Betteridge ve Fléchon (19) yaklaşık olarak 44 saat sonra (en erken 33. saatte), Xu ve Greve (18) ise 28. saatte ilk yarıklanma bölünmesinin (cleavage) görüldüğü bildirmişlerdir. Plante ve ark. (20) 30 saat içinde ilk yarıklanmayı tamamlayan embriyoların blastosist ve hatching dönemine daha çabuk geliştiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, in vitro olgunlaştırılmış sığır oositlerinin in vitro fertilizasyonu sonucu elde edilen erken dönemdeki embriyolar incelenerek fertilizasyon kriterleri, pronükleer senkronizasyon gibi konuların irdelenmesi amaçlandı. Ayrıca son yıllarda oldukça önem kazanan ve pronükleer dönemdeki embriyolara uygulanan gen

transferi gibi teknikler için bilinmesi gerekli olan, fertilizasyondan sonra pronükleusların tam olarak geliştiği sürenin saptanması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Çalışmanın materyalini Ismer mezbahasında (Tuzla-Istanbul) kesilen ineklerin ovaryumları oluşturdu. Ovaryumlar, içerisinde 30-35°C ısıda serum fizyolojik (%0.9 NaCl) bulunan termosoda konarak laboratuvara getirildi. İlk hayvanın kesiminden itibaren tüm oositlerin kazanılıp olgunlaşma medyumuna içerisinde inkübatöre konmasına kadar geçen sürenin 5 saatten daha fazla olmamasına özen gösterildi (21).

Oositlerin kazanılması ve olgunlaştırılması: Laboratuvara getirilen ovaryumlar, 30-35°C ısıda serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile yıkandı ve serum fizyolojik içerisinde bırakıldı. Ovaryumların yüzeyi bistüri ile değişik yönlerde kesildi ve bu kısımlar, içinde %1 oranında FCS (Fetal Calf Serum; Biochrom, S0115) bulunan %0.9 NaCl solüsyonu ile bir saat camına yıkandı. Yıkantı sıvısı stereo mikroskop altında değerlendirilerek en az 4 sıra kompakt kumulus hücre kitlesi ve homojen vitellusa sahip oositler olgunlaştırma amacıyla seçildi. Seçilen oositler, %10 oranında FCS ilaveli %0.9 NaCl solüsyonu bulunan mini petri kutularında (Greiner; 627 160) 3 kez pasajlandı ve olgunlaştırma medyumuna [%20 ECS ve FSH (Sigma; F8001) ilaveli MPM] içerisine alındı. Medyumların içerikleri Tablo 1'de yer almaktadır. Medyumlarda steril-apirojen enjeksiyonluk

Tablo 1. Çalışmada kullanılan medyumların bileşimleri.

Madde (mg/100 ml)	Modifiye Parker Medyumuna	Modifiye Tyrode Lactat Medyumuna (Swim-up için)	Modifiye Tyrode Lactat Medyumuna (Fertilizasyon için)
NaCl	-	580.0	666.0
KCl	-	23.0	23.5
NaHCO ₃	80.0	209.0	210.3
NaH ₂ PO ₄	-	3.5	4.7
CaCl ₂	-	28.8	39.7
MgCl ₂	-	-	10.0
Lactat-sirup %60	-	368 µl	186µl
Phenolred	-	1.0	1.0
Penicilline	-	6.5	6.5
HEPES	140.0	238.0	-
Na-Piruvat	25.0	-	-
Ca-laktat	60.0	-	-
Medium-199 (Sigma, T06105)	90 ml	-	-

su (Haver) kullanıldı ve bu stok medyuma yapılan ilaveler günlük olarak hazırlandı. Oositlerin olgunlaştırılması 4'lü petri kutularında (Nunc, 176740) ve petri kutularının her bir gözü (well) içerisinde 30-35 oosit olacak şekilde gerçekleştirildi. Bu şekilde hazırlanan petriler %100'e yakın nem ve 39°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) ısının sağlandığı, %5 CO₂, %5 O₂ ve % 90 Azot karışımı ile gazlanan anaerobik jar içerisinde inkübatöre yerleştirildi. Oositler 3 grup halinde 22, 24 ve 26 saat süreyle inkübe edildi.

Oositlerin fertilizasyonu: Fertilizasyon amacıyla payet yöntemiyle dondurulmuş boğa sperması kullanıldı. 3 ayrı grupta in vitro olgunlaştırılan oositler, olgunlaştırma sürelerinin bitiminde fertilizasyon medyumuna (Tablo 1) içerisine alındı. Donmuş boğa spermasını taşıyan payetler (2-3 adet) 37°C ısıdaki su banyosunda 30 saniye tutularak eritildikten sonra swim-up işlemine tabi tutuldu. Bu işlem için 90-120 (μl sperma, içlerine 1 ml BSA (Serva, 11930), Na-Piruvat (Sigma, P5280) ve gentamisin ilaveli kapasitasyon medyumuna (Tablo 1) konmuş tüplerin dip kısımlarına yavaşça bırakıldı. 45° eğimle 1 saat inkübasyona bırakılan bu tüplerin üst kısımlarındaki hareketli spermatozoonların bulunduğu medyum toplanarak 1000 devirde iki kez 10'ar dakika santrifüje edilerek yıkandı. Santrifüj sonunda üstteki kısım atıldı ve dipte kalan çökeltiden 10 (μl miktarındaki sperma (yaklaşık 400.000 adet spermatozoon/30-35 oosit) petrilerin her bir gözü içerisine bırakıldı. Fertilizasyon medyumuna olarak BSA, Heparin (Sigma, H3149), PHE (Na-Metabisülfid, hipotaurin, epinefrin), Na-Piruvat ilaveli modifiye Tyrode-laktat medyumuna (Tablo 1) kullanıldı. Oosit ve spermatozoonlar 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saat süre ile bir arada bırakıldı ve oositler bu sürelerin sonunda 3:1 oranında alkol:asetik asit karışımında 24 saat süreyle fikse edilerek %2'lik aseto-orsein ile boyandı. Faz kontrast mikroskop altında x400 büyütmede incelenen ovumlardaki fertilizasyon kriterlerinin değerlendirilmesinde Xu ve Greve (18)'in belirttiği kriterler esas alındı, fakat pronükleus gelişmesi 5 dönemle sınırlandırıldı.

Sonuçların değerlendirilmesinde Student t-testi ve (χ^2 testinden (22) yararlanıldı.

Bulgular

Çalışmada 22, 24 ve 26 saatlik 3 ayrı grupta olgunlaştırılan toplam 520 oosit (sırasıyla 122, 143 ve 255 oosit) kullanıldı. Olgunlaşma saatlerine göre, fertilizasyon oranları sırasıyla %47.5, %38.5 ve %46.3 oldu. Her bir grupta elde edilen sonuçların tümü (top-

lam, fertilize olan ve olmayan, monospermik ve polispermik oosit sayıları) Tablo 2'de yer almaktadır.

Fertilize olmuş ovumlardaki pronükleus dönemleri olgunlaşma saatlerine göre sırasıyla Tablo 3, 4 ve 5'te verildi. Bu tablolarda oositlerde fertilizasyondan sonra farklı sürelerdeki (sırasıyla 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saat) erkek ve dişi pronükleus dönemleri ayrıntılı olarak sunuldu. Erkek (Şekil 1-8) ve dişi pronükleuslar 1'den 5. döneme kadar gözlemlendi.

Fertilize olan oositlerdeki polispermi (Şekil 9) oranları olgunlaşma gruplarına göre sırasıyla %48.3, %27.3 ve %32.2 oldu.

Olgunlaşma ve fertilizasyon gruplarına göre fertilize olan, senkronize erkek ve dişi pronükleuslara (Şekil 10) ve 4-5 ve 5-5 döneminde senkronize pronükleuslara sahip olan ovum sayıları sırasıyla Tablo 6, 7 ve 8'de verildi. Bir dönemden daha farklı pronükleuslara sahip olan ovumlar asenkranöz olarak kabul edildi (Şekil 11-12). Spermatozoon penetrasyonu olmadan dişi pronükleusun gelişmesi şeklinde gözlenen oosit aktivasyonuna nadiren rastlandı ve pronükleer dönem değerlendirilmesine alınmadı (Şekil 13).

Tartışma

Çalışmada olgunlaşma gruplarına göre (22, 24, 26 saat) elde edilen toplam fertilizasyon oranları (sırasıyla, %47.5, %38.5 ve 46.3) birçok araştırmacının verilerinden (2,3,6,10,14,21) düşük olarak gerçekleşti. 24 saatlik olgunlaşma grubundaki düşük oran, diğer gruplara göre ileri düzeyde anlamlı (χ^2 , $p < 0.02$), 22 ve 26 saatlik gruplar arasındaki 22 saatlik grup lehine olan fark ise anlamlı bulundu (χ^2 , $p < 0.05$). 16 veya 20 saat olgunlaştırdıkları oositleri polar cisme sahip olanlar ve olmayanlar şeklinde ikiye gruba ayıran ve bunları fertilizasyondan 20 saat sonra inceleyen van der Westerlaken ve ark. (8), 16 saatlik grupta sırasıyla %55 \pm 7 ve %64 \pm 5, 20 saatlik grupta ise %54 \pm 6 ve %44 \pm 8 fertilizasyon oranları bildirmişlerdir. Bu veriler 22 saatlik olgunlaşma grubunda elde ettiğimiz verilere benzerdir.

Sunulan çalışmada fertilizasyon süresi 14 saatten 24 saate arttıkça penetre olan oosit sayısında (%41.7-%54.8) önemli bir artış olmazken, 22 ve 24 saatlik olgunlaşma gruplarında fertilizasyon grupları arasındaki farklılıklar istatistikî açıdan benzer (χ^2 , $p > 0.05$), 26 saatlik olgunlaşma grubunda ise 24 saatlik fertilizasyon grubundaki yüksek oran ileri düzeyde anlamlı bulundu (χ^2 , $p < 0.02$). Bu durum, penetrasyon oranının kültür süresi ile arttığını ve 28. saatte maksimum seviyeye

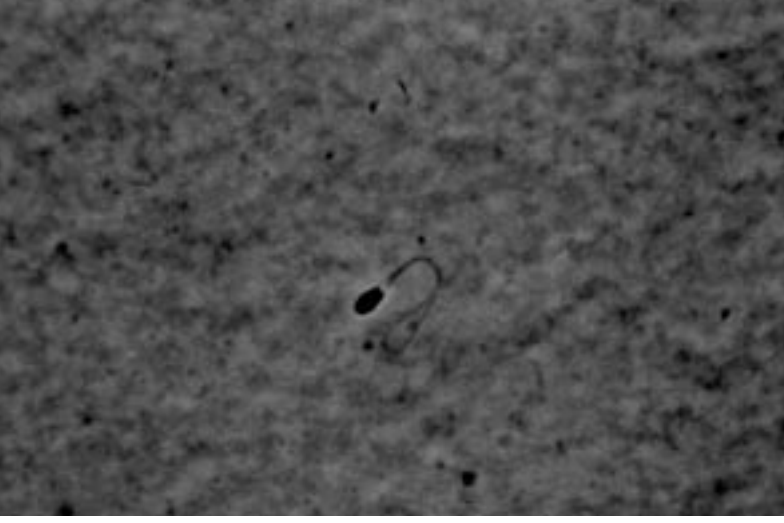
Tablo 2. Değişik olgunlaşma ve fertilizasyon sürelerine göre fertilize olmayan ve fertilize olan monospermik ve polispermik oosit sayıları.

Olgunlaşma süresi	Fertilizasyon süresi	Oosit sayısı	Fertilize olmamış	Fertilize Olmuş		
				Toplam (%)	Monospermik (%)	Polispermik (%)
22 saat	14 saat	25	12	13 (52.0)	6 (46.2)	7 (53.8)
	16 saat	15	10	5 (33.3)	4 (80.0)	1 (20.0)
	18 saat	20	11	9 (45.0)	5 (55.6)	4 (44.4)
	20 saat	22	11	11 (50.0)	5 (45.5)	6 (54.5)
	22 saat	19	10	9 (47.4)	5 (55.6)	4 (44.4)
	24 saat	21	10	11 (52.4)	5 (45.5)	6 (54.5)
Toplam		122	64	58 (47.5)	30 (51.7)	28 (48.3)
24 saat	14 saat	26	18	8 (30.8)	6 (75.0)	2 (25.0)
	16 saat	22	11	11 (50.0)	9 (81.8)	2 (18.2)
	18 saat	21	15	6 (28.6)	5 (83.3)	1 (16.7)
	20 saat	22	12	10 (45.5)	8 (80.0)	2 (20.0)
	22 saat	24	16	8 (33.3)	5 (62.5)	3 (37.5)
	24 saat	28	16	12 (42.9)	7 (58.3)	5 (41.7)
Toplam		143	88	55 (38.5)	40 (72.7)	15 (27.3)
26 saat	14 saat	45	26	19 (42.2)	16 (84.2)	3 (15.8)
	16 saat	41	20	21 (51.2)	10 (47.6)	11 (52.4)
	18 saat	41	23	18 (43.9)	10 (55.6)	8 (44.4)
	20 saat	38	27	11 (28.9)	8 (72.7)	3 (27.3)
	22 saat	46	25	21 (45.7)	18 (85.7)	3 (14.3)
	24 saat	44	16	28 (63.6)	20 (71.4)	8 (28.6)
Toplam		255	137	118 (46.3)	80 (67.8)	38 (32.2)

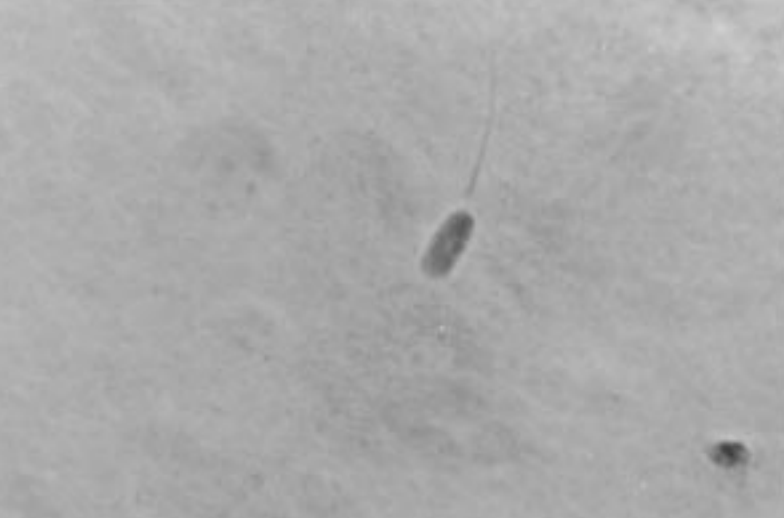
ulaştığını bildiren Xu ve Greve (18) ve Rehman ve ark. (6)'nın verileri ile uyumlu bulunmazken, oosit penetrasyon oranının spermatozoon konsantrasyonundan etkilendiğini, fakat spermatozoon ve oositin bir arada bırakıldığı inkübasyon süresinden etkilenmediğini bildiren Long ve ark. (17)'nin verilerine uyumlu olmuştur.

Olgunlaşma medyumundaki FCS ve ECS'nun etkilerini inceleyen Fukui ve Ono (4), 24 saatlik olgunlaşmada

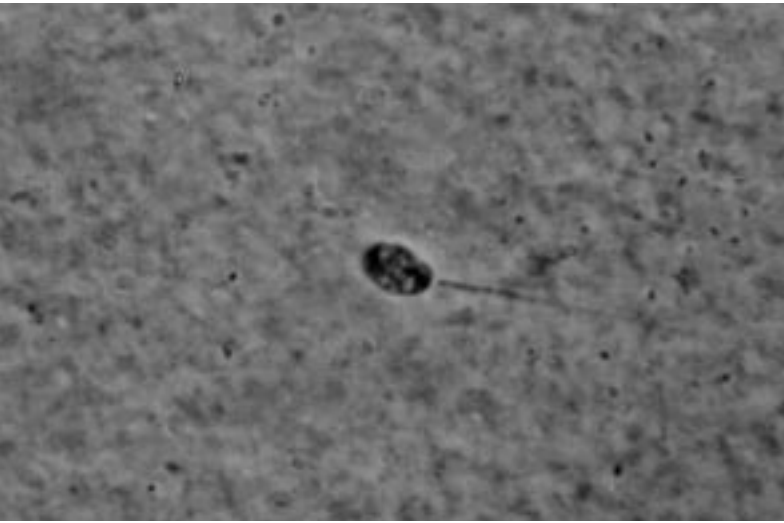
ECS kullanılan grupta (%34-52), FCS kullanılan gruptan (%57-71) daha düşük fertilizasyon oranları elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar (4), sunulan çalışmadaki gibi ECS ve hormon kullandıkları grupta (granülosa hücreleri olmadan) en düşük fertilizasyon oranını (%34.0±5.6) elde etmişlerdir. Çalışmada 24 saatlik olgunlaşma grubunda elde ettiğimiz oran (%38.5), bu orana benzerdir.



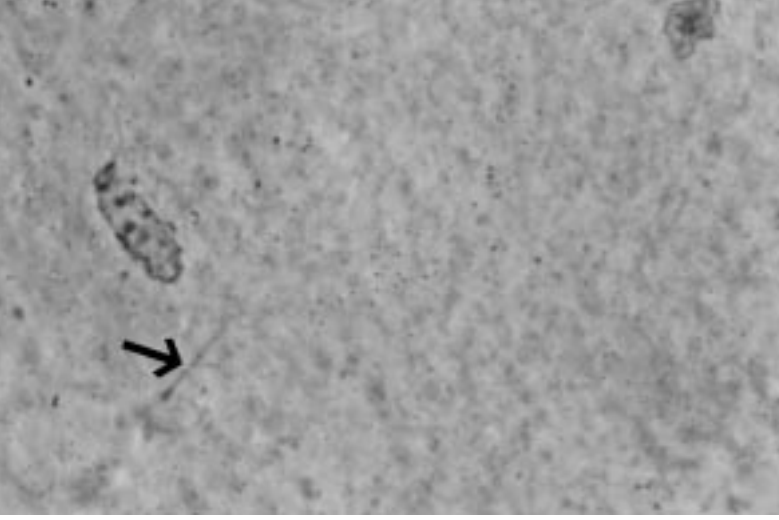
Şekil 1. Ovum içerisinde pronükleus (PN)-1 döneminde bir spermatozoon.



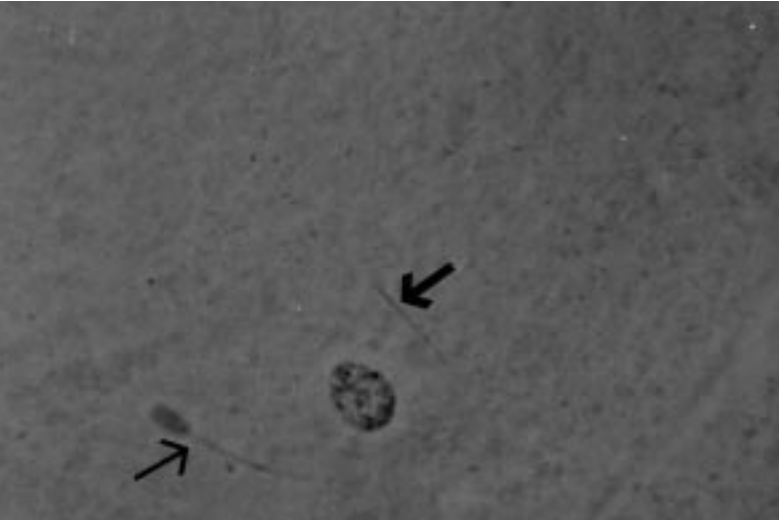
Şekil 2. PN-2 döneminde bir spermatozoon.



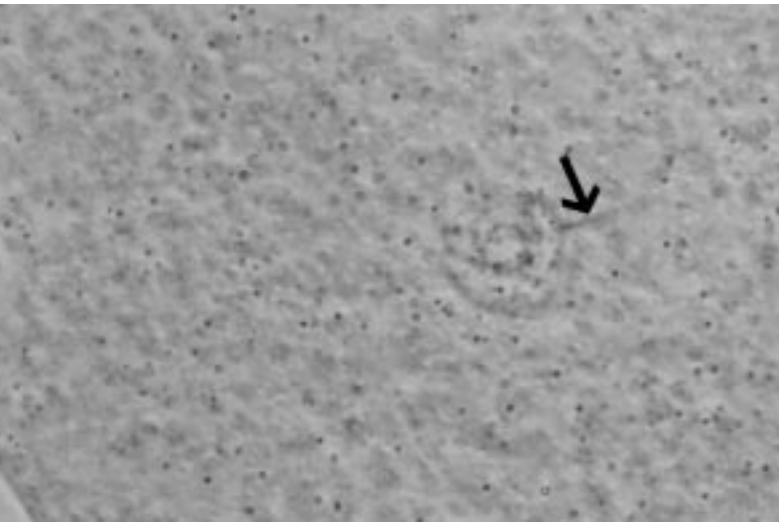
Şekil 3. PN-2 döneminde bir spermatozoon.



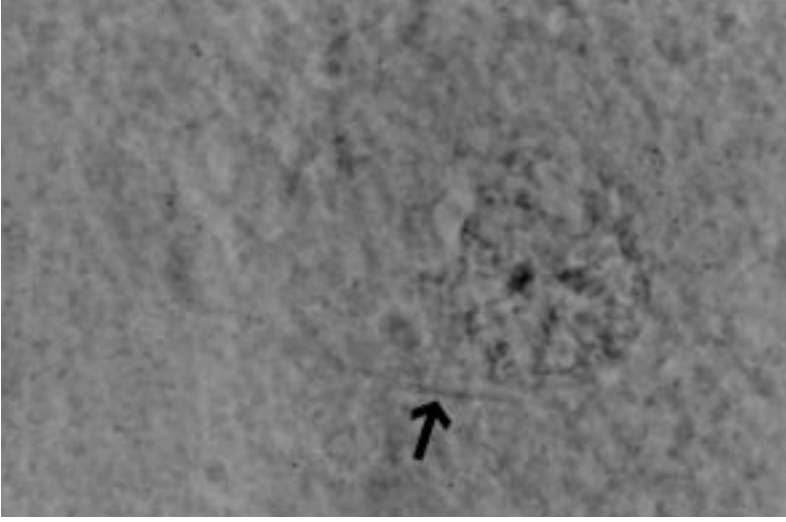
Şekil 4. PN-3 döneminde bir spermatozoon. → kuyruk



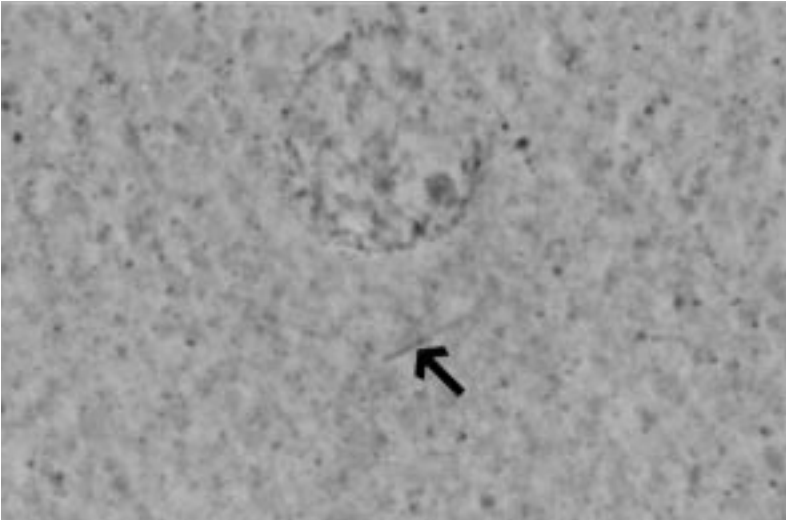
Şekil 5. PN-3 döneminde bir spermatozoon. → kuyruk; → ovum yüzeyindeki spermatozoon



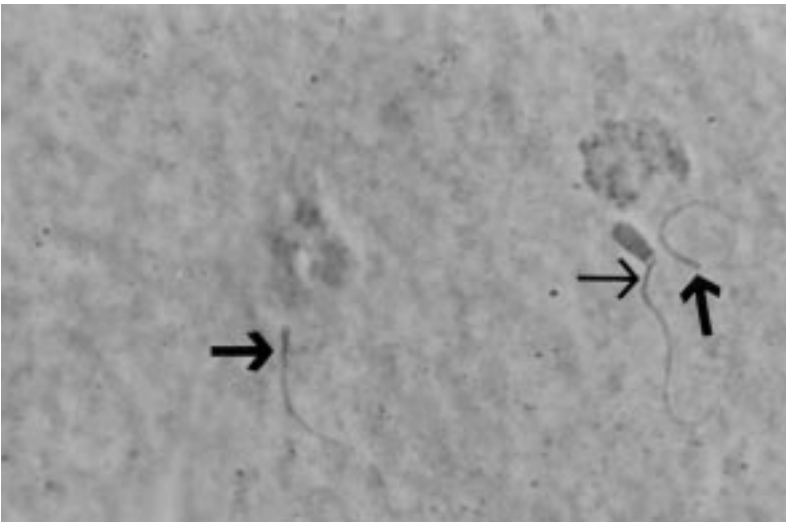
Şekil 6. PN-4 döneminde bir spermatozoon. → kuyruk



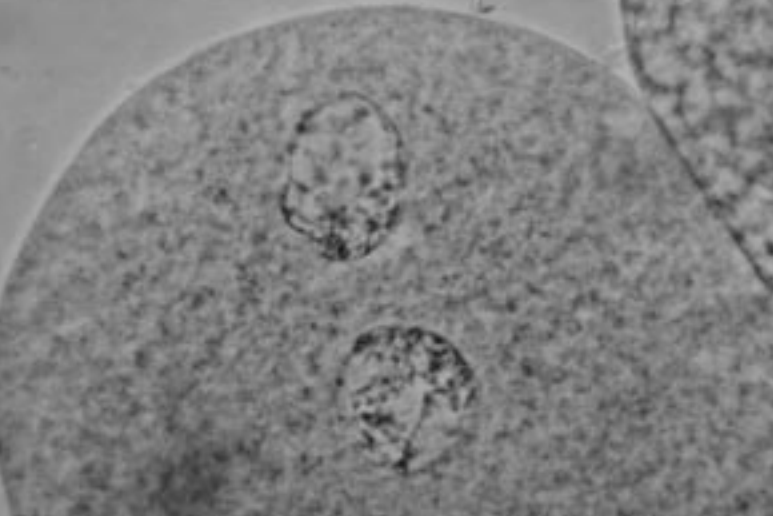
Şekil 7. PN-5 döneminde bir spermatozoon.
→ kuyruk



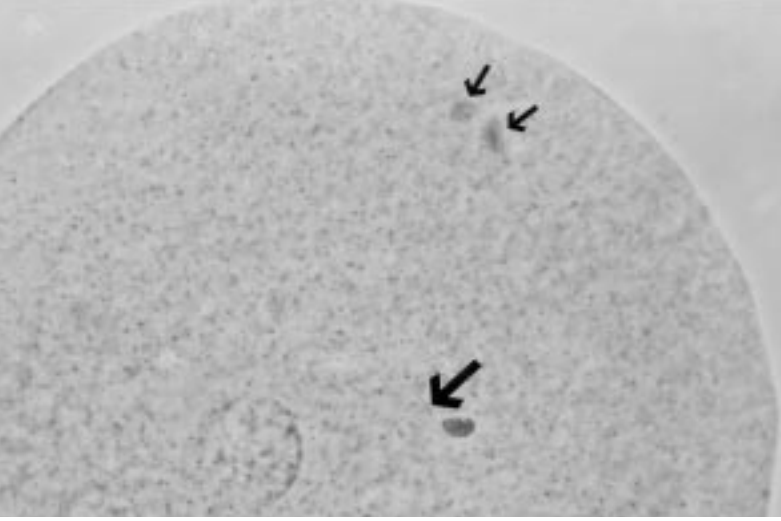
Şekil 8. PN-5 döneminde bir spermatozoon. → kuyruk



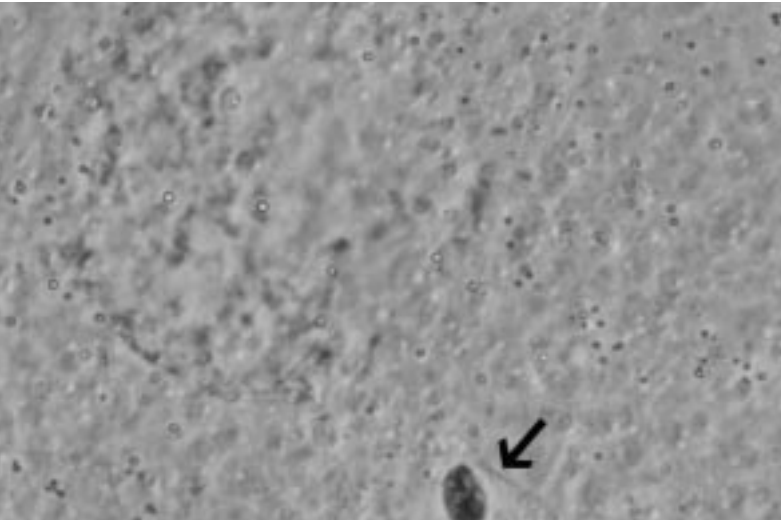
Şekil 9. PN-3-4 döneminde spermatozoonlar (polispermik ovum). → kuyruk; → ovumun yüzeyindeki spermatozoon



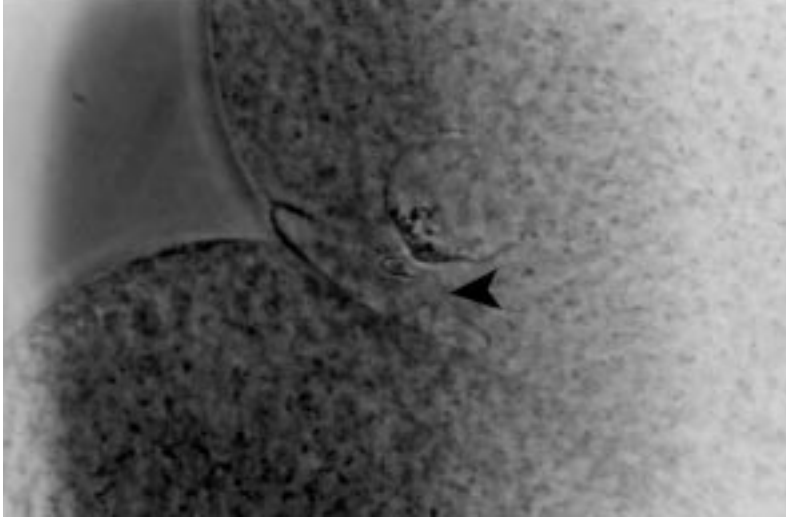
Şekil 10. Senkronize gelişmiş PN-5 döneminde erkek ve dişi PN'lara sahip ovum.



Şekil 11. Asenkronizasyon. Erkek PN-1 döneminde; dişi PN-5 döneminde → kuyruk; → polar cisimler



Şekil 12. Asenkronizasyon. Erkek PN-1 döneminde; dişi PN-5 döneminde → kuyruk;



Şekil 13. Spermatozoon penetrasyonu olmadan aktive olmuş ve 5. döneme ulaşmış dişi PN. ► 1. polar cisim

Tablo 3. 22 saatlik olgunlaşma döneminden sonra in vitro fertilize edilen ovullardaki pronükleusların fertilizasyondan sonra değişik saatlerdeki gelişme dönemleri.

Erkek	14. saatte (N=13)					16. saatte (N=5)				
	Dişi					Dişi				
	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5
PN-5					2					1
PN-4	1			1	1					1
PN-3	3	1			1					1
PN-2	1				1	1				1
PN-1					1					

Erkek	18. saatte (N=9)					20. saatte (N=11)				
	Dişi					Dişi				
	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5
PN-5					5					3
PN-4										
PN-3		1	1			1				
PN-2	1		1			5				2
PN-1										

Erkek	22. saatte (N=9)					24. saatte (N=11)				
	Dişi					Dişi				
	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5
PN-5					5					7
PN-4										
PN-3						2				
PN-2	3				1	1				1
PN-1										

Tablo 4. 24 saatlik olgunlaşma döneminden sonra in vitro fertilize edilen ovumlardaki pronükleusların fertilizasyondan sonra değişik saatlerdeki gelişme dönemleri.

Erkek	14. saatte (N=8)					16. saatte (N=11)				
	Dişi					Dişi				
	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5
PN-5	1				1	1				4
PN-4					1					
PN-3	1			1	1	4	1			
PN-2	1	1								1
PN-1										

Erkek	18. saatte (N=6)					20. saatte (N=10)				
	Dişi					Dişi				
	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5
PN-5					2		1			6
PN-4						1				1
PN-3	1									1
PN-2	3									
PN-1										

Erkek	22. saatte (N=8)					24. saatte (N=12)				
	Dişi					Dişi				
	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5
PN-5	1				7	1				7
PN-4										
PN-3						2				
PN-2						2				
PN-1										

Kültür ortamındaki O₂ konsantrasyonunun fertilizasyon üzerine etkisini inceleyen Pinyopummintr ve Bavis-ter (5), %5, %10 ve %20 oranında O₂ kullandıkları gruplarda sırasıyla %53.1, %80.3 ve %87.0 fertilizasyon oranları bildirmişlerdir. Bu çalışmada %5 O₂, %5 CO₂ ve %90 N₂ karışımı kullanıldığı için, düşük fertilizasyon oranları bir ölçüde açıklanabilmektedir.

Sunulan çalışmada fertilize olan oositlerde, olgunlaşma gruplarına (22, 24 ve 26 saat) göre sırasıyla 30 (%51.7), 40 (%72.7) ve 80 (%67.8) monospermik fertilizasyon saptandı. 22 saatlik grup ile 24 ve 26 saatlik gruplar arasındaki fark istatistikî açıdan anlamlı iken (p<0.05), 24 ve 26 saatlik gruplar arasındaki fark benzer oldu (p>0.05). 24 saatlik olgunlaşma gru-

bunda saptanan polispermik fertilizasyon oranı (%27.3), in vitro olgunlaştırma için 24 saatlik inkübas-yon uygulayan Chian ve ark. (3)'nin saptadığı orana (%26) benzerdir. Buna karşın, 27 saate kadar in vitro olgunlaştırma uygulayan Xu ve Greve (18)'in fertilizasyon- yondan 12, 16, 20, 24 ve 28 saat sonra saptadıkları polispermik oosit oranları (sırasıyla, %6.3, 10.7, 5.2, 16.1 ve 17.0), bu çalışmadaki 26 saatlik olgunlaşma grubunda fertilizasyondan 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saat sonra saptanan oranlardan (sırasıyla, %15.8, 52.4, 44.4, 27.3, 14.3 ve 28.6) oldukça düşüktür. Aynı şekilde 24 saatlik olgunlaşma grubunda elde edilen polispermik fertilizasyon oranı, Fukui ve Ono (4) (%2-19) ve hiç polispermi kaydedilmediğini bildiren Xu

Tablo 5. 26 saatlik olgunlaşma döneminden sonra in vitro fertilize edilen ovumlardaki pronükleusların fertilizasyondan sonra değişik saatlerdeki gelişme dönemleri.

Erkek	14. saatte (N=19)					16. saatte (N=21)				
	Dişi					Dişi				
	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5
PN-5	2			1	5			1	1	10
PN-4				1	2				1	1
PN-3		1	2		1			3		1
PN-2	1	1			1	3				
PN-1	1									

Erkek	18. saatte (N=18)					20. saatte (N=11)				
	Dişi					Dişi				
	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5
PN-5					11					6
PN-4	1		1							1
PN-3	1				1					1
PN-2	1		1			1				2
PN-1	1									

Erkek	22. saatte (N=21)					24. saatte (N=28)*				
	Dişi					Dişi				
	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5	PN-1	PN-2	PN-3	PN-4	PN-5
PN-5					13					21
PN-4										2
PN-3	1									
PN-2	1		1	1	4	4				
PN-1						1				

* Bu grupta 2 embriyo 2-blastomerli döneme ulaştı.

ve ark.(21)'nin verilerinden oldukça yüksektir. Xu ve ark. (21), elde edilen yüksek başarı (monospermik fertilizasyon) oranının sebeplerinden biri olarak mezbahadan oosit aspirasyonuna kadar geçen sürenin kısıllığını (<30 dakika) göstermişlerdir.

GV dönemindeki sığır oositlerini fertilize eden Abeydeera ve ark. (9), fertilizasyondan 8 saat sonra kültür medyumuna aktararak 15-40 saat kültüre ettikleri oositlerde polispermimin çok yaygın olduğunu (%67-80) saptamışlardır. Bu durum oosit olgunlaşmasının yeterli olmadığı durumlarda polispermimin yüksek olduğunu düşündürmektedir.

24 saatlik olgunlaşmayı takiben, oositleri spermatozoonlarla 18 saat birarada bırakan Pinyopummintr ve Bavister (5), %5, %10 ve %20 oranında O₂ kullandıkları 3 grupta sırasıyla %26.6, 28.8 ve 15.4 polispermi oranları bildirmişlerdir. Araştırmacılar (5) düşük O₂ oranının yüksek polispermiden sorumlu olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamızda in vitro olgunlaşma ve fertilizasyon oranlarının düşük olması kadar, polispermi oranlarının yüksek olmasının da kısmen bu negatif durumdan kaynaklanabildiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada fertilize olan oositlerde erkek ve dişi pronükleusların senkronizasyonu (erkek ve dişi pronük-

Tablo 6. Olgunlaşma ve fertilizasyon gruplarına göre fertilize olan oosit sayıları (%).

Olgunlaşma süresi (saat)	Fertilizasyon süresi (saat)						Toplam
	14	16	18	20	22	24	
22	13/25 (52.0)	5/15 (33.3)	9/20 (45.0)	11/22 (50.0)	9/19 (47.4)	11/21 (52.4)	58/122 (47.5) ^a
24	8/26 (30.8)	11/22 (50.0)	6/21 (28.6)	10/22 (45.5)	8/24 (33.3)	12/28 (42.9)	55/143 (38.5) ^c
26	19/45 (42.2)	21/41 (51.2)	18/41 (43.9)	11/38 (28.9)	21/46 (45.7)	28/44 (63.6)	118/255 (46.3) ^b
Toplam	40/96 (41.7)	37/78 (47.4)	33/82 (40.2)	32/82 (39.0)	38/89 (42.7)	51/93 (54.8)	

a,b,c Farklı harf taşıyan oranlar arasındaki farklar anlamlıdır (χ^2 ; $p<0.05$).

Tablo 7. Olgunlaşma ve fertilizasyon gruplarına göre senkronize erkek ve dişi pronükleuslara sahip olan oosit sayıları (%).

Olgunlaşma süresi (saat)	Fertilizasyon süresi (saat)						Toplam
	14	16	18	20	22	24	
22	6/13 (46.2)	3/5 (60.0)	9/9 (100.0)	8/11 (72.7)	8/9 (88.9)	8/11 (72.7)	42/58 (72.4) ^b
24	5/8 (62.5)	5/11 (45.5)	5/6 (83.3)	7/10 (70.0)	7/8 (87.5)	9/12 (75.0)	38/55 (69.1) ^b
26	15/19 (78.9)	19/21 (90.5)	15/18 (83.3)	8/11 (72.7)	15/21 (71.4)	28/28 [#] (100.0)	100/118 (84.7) ^a
Toplam	26/40 (65.0)	27/37 (73.0)	29/33 (87.9)	23/32 (71.9)	30/38 (78.9)	43/49 (87.7)	

a,b Farklı harf taşıyan oranlar arasındaki farklar anlamlıdır (χ^2 ; $p<0.001$).

Fertilize olan 28 ovumdan 2 tanesi 2 hücreli döneme ulaştı.

Tablo 8. Olgunlaşma ve fertilizasyon gruplarına göre, 4-5 ve 5-5 döneminde senkronize pronükleuslara sahip olan oosit sayıları (%).

Olgunlaşma süresi (saat)	Fertilizasyon süresi (saat)						Toplam
	14	16	18	20	22	24	
22	3/6 (50.0)	2/3 (66.7)	5/9 (55.6)	3/8 (37.5)	5/8 (62.5)	7/8 (87.5)	25/42 (59.5) ^c
24	2/5 (40.0)	4/5 (80.0)	2/5 (40.0)	7/7 (100.0)	7/7 (100.0)	7/9 (77.8)	29/38 (76.3) ^a
26	8/15 (53.3)	12/19 (63.2)	11/15 (73.3)	7/8 (87.5)	13/15 (86.7)	23/28 (82.1)	74/100 (74.0) ^b
Toplam	13/26 (50.0)	18/27 (66.7)	18/29 (62.1)	17/26 (65.4)	25/30 (83.3)	35/43 (81.4)	

a,b,c Farklı harf taşıyan oranlar arasındaki farklar ileri düzeyde anlamlıdır (χ^2 ; $p<0.01$).

leusların aynı dönem veya en fazla 1 dönem farklı olması durumu) incelendi ve olgunlaşma gruplarına göre (22, 24 ve 26 saat) sırasıyla %72.4, %69.1 ve %84.7 senkronizasyon saptandı. 26 saatlik grup ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiki açıdan ileri düzeyde anlamlı bulundu (χ^2 , $p<0.001$). Xu ve Greve (18), 12, 16, 20, 24 ve 28 saat fertilize ettikleri ovumlar içinde asenkranöz ovum oranlarını sırasıyla %35.7, 26.9, 40.0, 33.9 ve 12.8 olarak bildirmişlerdir. Sunulan araştırmadaki asenkranöz ovum oranları bu araştırmacıların (18) bulduğu değerlerden daha düşüktür ve fertilizasyon süresi 14 saatten 24 saate ilerledikçe senkronizasyon oranının arttığı görülmüştür. 14 ve 24. saatler arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0.05$).

Xu ve Greve (18), senkronizasyon oranının düşük olmasını spermatozoon başının dekondenzasyon yetersizliğine ve pronükleus gelişmesinin gecikmesine bağlamışlar, dişi pronükleus gecikmesine daha az rastlandığını belirtmişlerdir. Nakagawa ve ark. (10), 14, 20, 24 veya 28 saat olgunlaştırılan oositlerin 8 saat spermatozoonlarla bir arada bırakılmasını takiben erkek ve dişi pronükleuslara sahip oosit oranlarını sırasıyla %10.0, 30.5, 56.3 ve 36.8 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar

(10), 28 saatlik olgunlaşma grubundaki pronükleusların %29 oranında asenkranöz gelişme gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu oran 26 saatlik olgunlaşma grubumuzda, 14 saatlik fertilizasyondan sonra elde edilen orana (senkronizasyon = %78.9; asenkronizasyon = %21.1) benzerdir.

Fertilizasyondan 8, 12, 16, 20, 24 ve 28 saat sonra yapılan incelemelerde %0, 14.3, 44.4, 37.8, 53.2 ve 83.0 oranında, 5 ve 6. döneme ulaşmış senkronize pronükleuslara sahip ovumlar elde eden Xu ve Greve (18)'in verilerinin, olgunlaşma saatleri göz önüne alınmadığında fertilizasyondan 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saat sonra saptanan verilerimizden (sırasıyla %50.0, 66.7, 62.1, 65.4, 83.3 ve 81.4) daha düşük olduğu gözlemlendi. Çalışmada elde edilen bu oranların fertilizasyon süresi arttıkça yükseldiği saptandı ve 14. saat ile 22 ve 24. saatler arasındaki farklar ileri düzeyde anlamlı bulundu ($p<0.01$). Senkronize pronükleuslara sahip ovumlar içerisinde en az 1 pronükleus açısından 5. döneme ulaşanların oranları, olgunlaşma gruplarına göre (22, 24 ve 26 saat) sırasıyla %59.5, 76.3 ve 74.0 oldu ve 22 saatlik gruptaki düşük oran diğer gruplara göre çok ileri düzeyde (χ^2 , $p<0.001$), 24 saatlik gruptaki yüksek oran ise 26 saatlik gruba göre ileri düzeyde anlamlı bulundu (χ^2 , $p<0.01$).

Çalışmada, 26 saatlik olgunlaşma grubundaki fertilizasyon aşamasının 24. saatinde 2 tane (%1.7) 2 hücreli embriyo saptandı. Bu durum kapasite edilmiş spermatozoonlara in vitro maruz bırakılan oositlerde yaklaşık olarak 44 saat sonra (en erken 33. saatte) yarıklanmanın (cleavage) görüldüğünü bildiren Betteridge ve Fléchon (19) ile uyumlu olmazken, ilk yarıklanmanın ve 2 hücreli embriyoların 28. saatte gözlemlendiğini bildiren Xu ve Greve (18) ve 30 saat içinde ilk yarıklanmayı tamamlayan embriyoların blastosist ve hatching dönemine daha çabuk geliştiğini bildiren Plante ve ark. (20)'nin verilerine benzer görüldü.

Sonuç olarak, in vitro 22 saatlik olgunlaşma süresinin sığır oositleri açısından yetersiz olduğu, normal (monospermik) fertilizasyon oranının yüksek olması için 24 ve 26 saatlik olgunlaşma süresinin tercih edilmesi gerektiği söylenebilir. Ayrıca gen transferi gibi mikro-manipulasyon uygulamaları amacıyla embriyoların özellikle in vitro fertilizasyonun 20. saatinden itibaren kullanılabilmesi ortaya çıkmaktadır. Dünyada büyük önem kazanan bu tekniklerin ülkemizde de geliştirilmesi amacıyla çok sayıda araştırmaya gereksinim duyulmaktadır.

Kaynaklar

- Bağış, H. (1994): Transgenik fare eldesine yönelik çalışmalar. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, İstanbul. Doktora Tezi.
- Chian, R.C. and Niwa, K. (1994): Effect of cumulus cells present during different periods of culture on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41: 176 (Abstr.)
- Chian, R.C., Niwa, K. and Sirard, M.A. (1994): Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 41: 1499-1508.
- Fukui, Y. and Ono, H. (1989): Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 86: 501-506.
- Pinyopummintr, T. and Bavister, B.D. (1994): Effect of gaseous atmosphere on in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41: 276 (Abstr.)
- Rehman, N., Collins, A.R., T.K. Suh and Wright, R.W. Jr. (1994): Effect of sperm exposure time on in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 41: 1447-1452.
- Semple, E., Loskutoff, N., Leibo, S.P. and Betteridge, K.J. (1993): Effects of culture medium and maturation time on in-vitro development of bovine oocytes into blastocysts. *Theriogenology*, 39: 307 (Abstr.)
- van der Westerlaken, L.A.J., de Wit, A.A.C., van der Schans, A., Eyestone, W.H., de Boer, H. (1992): Relationship between kinetics of polar body extrusion and developmental potential of bovine oocytes. 12 th. Int.Cong. on Anim.Repr., 1: 384-386.
- Abeydeera, L.R., Niwa, K., Okuda, K. (1993): Maturation-promotion factor (MPF) is responsible for the transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes in maturing bovine oocytes in vitro. *J.Reprod.Fertil.* 98 (2): 409-414 (Abstr.)
- Nakagawa, A., Martino, A., Pollard, J.W., Leibo, S.P. (1995): Stage of nuclear maturation of bovine oocytes at insemination influences sperm penetration and zygote development. *Theriogenology*, 43: 286 (Abstr.)
- Kubisch, H.M., Hernandez-Ledezma, J.J., Larson, M.A., Sikes, J.D., Roberts, R.M. (1995): Expression of two transgenes in in vitro matured and fertilized bovine zygotes after DNA microinjection. *J.Reprod.Fertil.*, 104: 133-139 (Abstr.)
- Bazer, F.W., Geisert, R.D., and Zavy, M.T. (1993): Fertilization, cleavage, and implantation. 188-212. E.S.E. Hafez (Ed) In: *Reproduction in Farm Animals*, 6 th edition, Lea & Febiger, Philadelphia.
- Fraser, L.R. (1984): Mechanisms controlling mammalian fertilization. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 6: 174-225.
- Saeki, K. Leibfried-Rutledg, M.L. and First, N.L. (1990): Are fetal calf serum and hormones necessary during in vitro maturation of cattle oocytes for subsequent development? *Theriogenology*, 33: 316 (Abstr.)
- Thibault, C. (1977): Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J.Reprod.Fertil.* 51: 1-15.
- Xu, K.P. and King, W.A. (1990): The biology of mammalian fertilization and embryo development. *AgBiotech News and Information*, 2: 25-28.
- Long, C.R., Damiani, P., Pinto-Correia, C., MacLean, R.A., Duby, R.T., Robl, J.M. (1994): Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions on fertilization. *J.Reprod.Fertil.* 102 (2): 361-369 (Abstr.)
- Xu, K.P. and Greve, T. (1988): A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 82: 127-134.
- Betteridge, K.J., Fléchon, J.E. (1988): The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, 29: 155-187.
- Plante, L., Plante, C., Shepherd, D.L., King, W.A. (1994): Cleavage and H-3-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Molecular Reproduction and Development*, 39: 375-383 (Abstr.)
- Xu, K.P., Greve, T., Callesen, H. and Hyttel, P. (1987): Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 81: 501-504.
- Şenocak, M. (1990): *Temel Biyoistatistik. Çağlayan Kitabevi, İstanbul.*