

Sığır Oositlerinin İn Vitro Olgunlaştırılmasında Farklı Sürelerin Etkisi*

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

Geliş Tarihi: 29.01.1997

Özet: Mezbahada kesilen ineklerin ovaryumlarından elde edilen oositler (n=157), FSH (Folikül Stimulan Hormon) ve %20 ECS (Östrastaki inek serumu) ilaveli modifiye Parker medyumu (MPM) içerisinde, %5 O₂, %5 CO₂ ve %90 Azot gaz karışımı altında %95-100 nem ve 39°C ısı şartlarında 22 (n=52), 24 (n=52) ve 26 (n=53) saat olgunlaştırıldı. Bu sürelerin sonunda oositlerin tümü pipetleme yoluyla kumulus hücrelerinden ayrıldı ve hazırlanan preparat 3:1 oranında alkol:asetik asit karışımında 24 saat fikse edildi. Fiksasyon süresinin sonunda oositler %2'lik aseto-orsein ile boyanarak olgunlaşma kriterleri değerlendirildi.

22, 24 ve 26 saatlik olgunlaşma gruplarında sırasıyla 23 (%44.2), 27 (%51.9) ve 30 (%56.6) oosit Metafaz I ve II dönemlerine ulaştı. Gruplar arasındaki farklar istatistiki olarak önemli bulunmadı (p>0.05).

Anahtar Sözcükler: Sığır, in vitro olgunlaştırma, olgunlaştırma süresi.

Effects of Different Maturation Periods on In Vitro Maturation of Bovine Oocytes

Abstract: Primer oocytes (n=157) collected from ovaries of slaughtered cows were matured at 39°C with 95-100% humidity and under a gas mixture of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ for 22 (n=52), 24 (n=52) and 26 (n=53) hours. Modified Parker's Medium (MPM) supplemented with FSH and 20% ECS was used as maturation medium. At the end of these periods all oocytes were fixated in ethanol:acetic acid in the ratio of 3:1 for 24 hours and stained by %2 aceto-orsein to evaluate the maturational criteria.

At the 22, 24 and 26-hours maturation groups, 23(%44.2), 27 (%51.9) and 30 (%56.6) oocytes reached the metaphase I and II stages, respectively. The difference among the groups was not important statistically (p>0.05).

Key Words: Bovine, in vitro maturation, maturation time.

Giriş

Günümüzde oldukça değer kazanan in vitro fertilizasyon tekniklerinin ilk aşaması, ovaryumlardaki 2-6 mm. çapındaki folliküllerden alınan primer oositlerin uygun medyuma bırakılarak sekonder oosit haline getirilmesini kapsayan olgunlaştırma işlemidir.

Memeli hayvanlarda mitoz bölünme ile çoğalan oositler, fetal yaşam esnasında ilk mayotik bölünmeye başlar. Fakat doğumdan önce veya hemen sonra 1. mayoz bölünme profaz safhasında durur. Bu dönemde germinal vezikül (GV) olarak isimlendirilen yapı oluşmuştur. Mayoz bölünme, puberteyi takiben ovulasyondan kısa bir süre önce veya oositler folliküllerden alınıp uygun bir medyuma bırakıldığında sitoplazmik olgunlaşmayı ilerletici bir faktör (Maturation Promoting Factor; MPF) etkisi ile tekrar başlar. Ovulasyondan hemen önce, memeli oositleri olgunlaşmanın son fazını tamamlamadan fertilize olma ve fertilizasyon olsa dahi erken embriyonik gelişme yeteneğine sahip değildir (1, 2, 3, 4, 5).

Mayozun tekrar başlaması germinal vezikülün yıkılmasından (GV-Brakedown; GVBD) ve bunu takiben ilk

polar cismin atılması ile karakterizedir. Bu dönemde ovulasyona uğrayan oosit, fertilizasyona kadar 2. mayoz bölünmenin metafaz safhasında bekler. Fertilizasyon mayotik bölünmenin tamamlanmasını uyarır ve 2. polar cisim atılır. Fertilizasyon sonrası erkek ve dişi pronükleuslar oluşur. Bu dişi ve erkek pronükleusların füzyonu ile fertilizasyon olayı tamamlanır (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırma süreleri çeşitli araştırmacılar tarafından 18-20 saat (10, 11), 22 saat (12), 20-22 saat (13), 20-24 saat (14), 24 saat (2, 4, 15, 16, 17, 18, 19), 24-26 saat (9) ve 27 saat (20, 21) olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada in vitro fertilizasyonun başarısında oldukça etkili olan in vitro olgunlaştırma ele alınarak, sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırılması için gerekli olan süre ve olgunlaşma kriterleri incelendi.

Materyal ve Metot

Çalışmanın materyalini İsmir mezbahasında (Tuzla-İstanbul) kesilen ineklerin ovaryumları oluşturdu.

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

Tablo 1. Modifiye Parker Medyumunun bileşimi.

Madde (mg/100 ml)	Miktar
NaCl	-
KCl	-
NaHCO ₃	80.0
NaH ₂ PO ₄	-
CaCl ₂	-
MgCl ₂	-
Lactat-sirup %60	-
Phenolred	-
Penicilline	-
HEPES	140.0
Na-Pyruvate	25.0
Ca-lactate	60.0
Medium-199 (Sigma, T06105)	90 ml

Olgunlaşma süresi	Oosit sayısı (N)	Germinal Vezikül (%)	Diakinez (%)	Metafaz I (%)	Metafaz II (%)
22 saat	52	17 (32.7)	12 (23.1)	17 (32.7)	6 (11.5)
24 saat	52	11 (21.2)	14 (26.9)	16 (30.8)	11 (21.1)
26 saat	53	16 (30.2)	7 (13.2)	21 (39.6)	9 (17.0)

Tablo 2. Değişik sürelerde olgunlaştırılan oositlerin bu süreler sonundaki gelişme dönemleri.



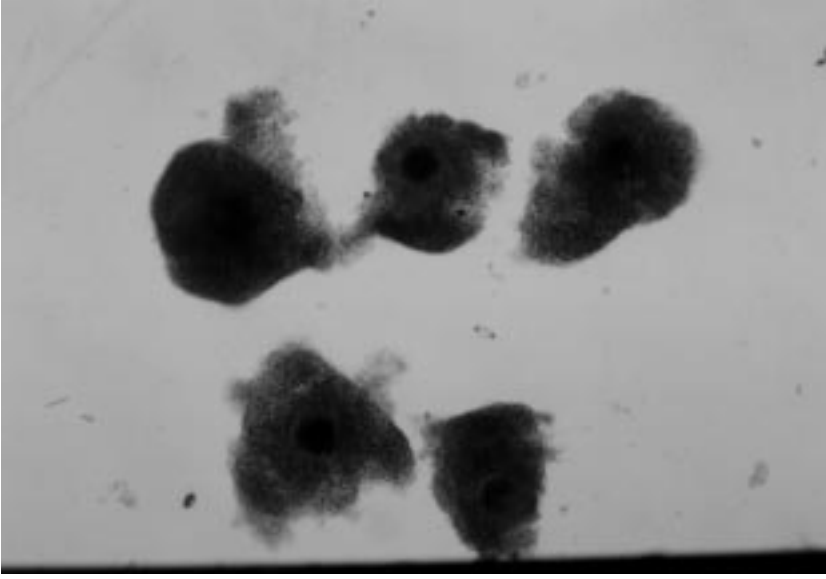
Şekil 1. Oosit kazanmak için ovaryum yüzeyinin değişik yönlerde kesilmesi.

Ovaryumlar, içerisinde 30-35°C ısıda serum fizyolojik (%0.9 NaCl) bulunan termosada 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.

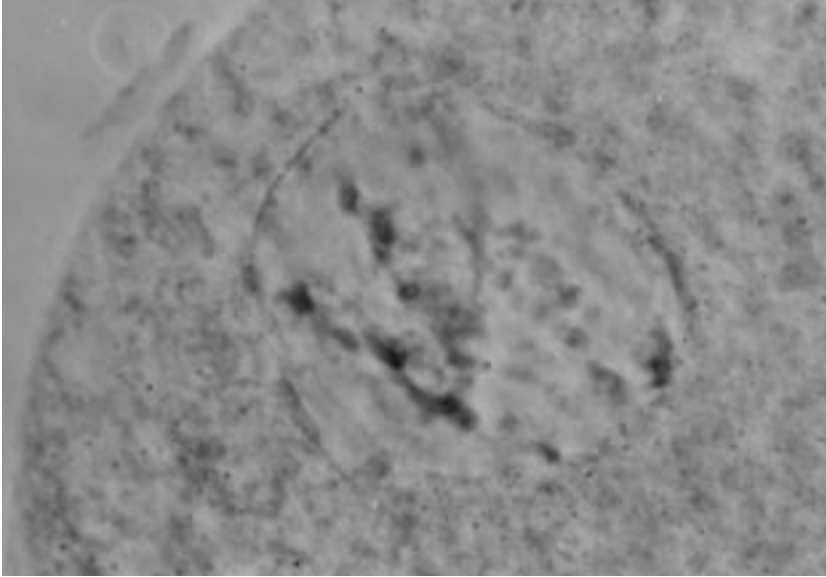
Laboratuvara getirilen ovaryumlar 30-35°C ısıda serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile yıkandı ve serum fizyolojik içerisinde bırakıldı. Ovaryumların yüzeyi bistüri ile değişik yönlerde kesildi (Şekil 1) ve kesitler, içinde %1 oranında FCS (Fetal Calf Serum; Biochrom, S0115) bulunan yaklaşık olarak 35-38°C ısıda %0.9 NaCl ile bir saat camına yıkandı. Yıkantı sıvısı stereo mikroskop altında değerlendirilerek en az 4 sıra kompakt kumulüs hücre kitlesi ve homojen vitellusa sahip oositler (Şekil 2)

olgunlaştırma amacıyla seçildi. Seçilen oositler, %10 oranında FCS ilaveli %0.9 NaCl bulunan mini petri kutularında (Greiner; 627 160) 3 kez pasajlandı ve olgunlaştırma medyumuna [% 20 ECS ve FSH (Sigma; F8001) ilaveli MPM] içerisine alındı. Medyumun içeriği Tablo 1'de görülmektedir. Medyumlarda steril-apirojen enjeksiyonluk 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 20-25 oosit olacak şekilde gerçekleştirdi. Bu şekilde hazırlanan petripler %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 (n=52), 24 (n=52) ve 26 (n=53) saat süreyle inkübe edildi. Bu süreler sonunda her gruptan oositlerin tümü pipetleme yoluyla kumulüs hücrelerinden ayrıldı ve preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar 3:1 oranında alkol:asetik asit karışımında 24 saat süreyle fikse edildi ve %2'lik aseto-orsein ile boyanarak olgunlaşma kriterleri açısından değerlendirildi. Oositlerdeki olgunlaşma kriterleri olarak germinal vezikülün yıkılması ve oosit nükleusunun M I ve daha sonra 1. polar cismin atılmasıyla M II'ye ulaşması kabul edildi (Şekil 3-9).

Verilerin istatistikî değerlendirilmesinde *t*-Testinden yararlanıldı.



Şekil 2. Kesilen ovaryum yüzeyinin yıkanması ile elde edilen oositler.



Şekil 3. Germinal vezikül (GV) döneminde bir primer oosit.

Bulgular

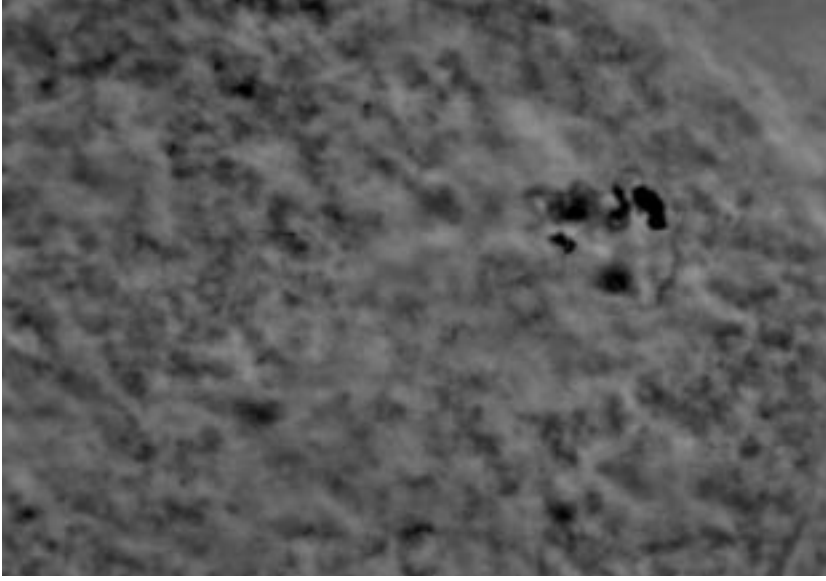
Çalışmada 157 oosit kullanıldı. Oositlerin 22 saat olgunlaştırıldığı grupta (n=52) 17 oosit (%32.7) germinal vezikül (GV) döneminde kalırken, 12 oosit (%23.1) diakinez, 17 tanesi (%32.7) Metafaz I (M I) ve 6 tanesi (%11.5) M II dönemine ulaştı. 24 saatlik gruptaki (n=52) GV, Diakinez, M I ve M II dönemlerindeki oosit sayıları sırasıyla 11 (%21.2), 14 (%26.9), 16 (%30.8) ve 11 (%21.1) iken, 26 saatlik olgunlaşma grubunda (n=53) ise sırasıyla 16 (%30.2), 7 (%13.2), 21 (%39.6) ve 9 (%17.0) oldu.

Çalışmada 22, 24 ve 26 saatlik olgunlaşma sürelerinin sonunda sırasıyla 35 (%67.3), 41 (%78.8) ve 37 (%69.8) oositin mayoza devam ettiği gözlenirken, metafaz dönemine ulaşan (M I + M II) oosit sayıları 22, 24 ve 26 saatlik olgunlaşma gruplarında sırasıyla 23 (%44.2), 27 (%51.9) ve 30 (%56.6) olarak saptandı.

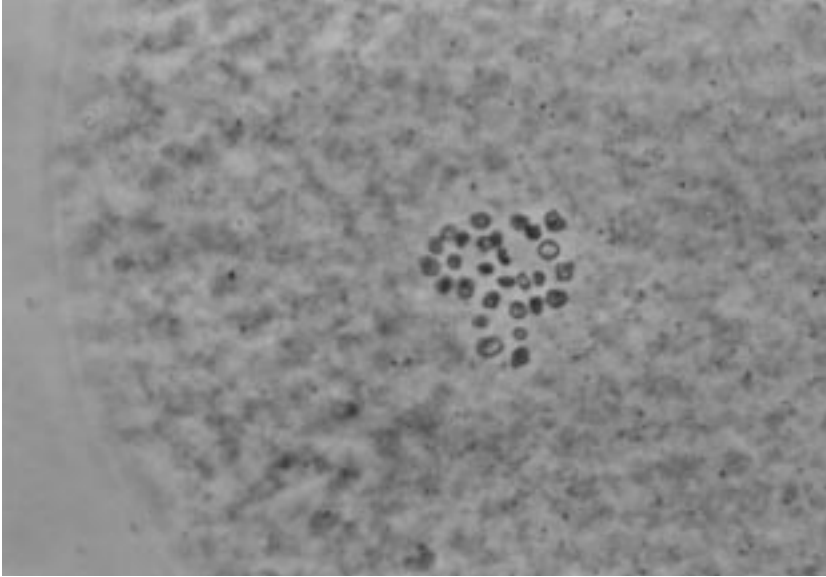
Elde edilen verilerin tamamı Tablo 2'de sunuldu.

Tartışma

Mezbaha materyalinden elde edilen primer oositlerin in vitro olgunlaştırıldığı bu çalışmada mayoza devam eden



Şekil 4. Diakinez döneminde bir primer oosit.

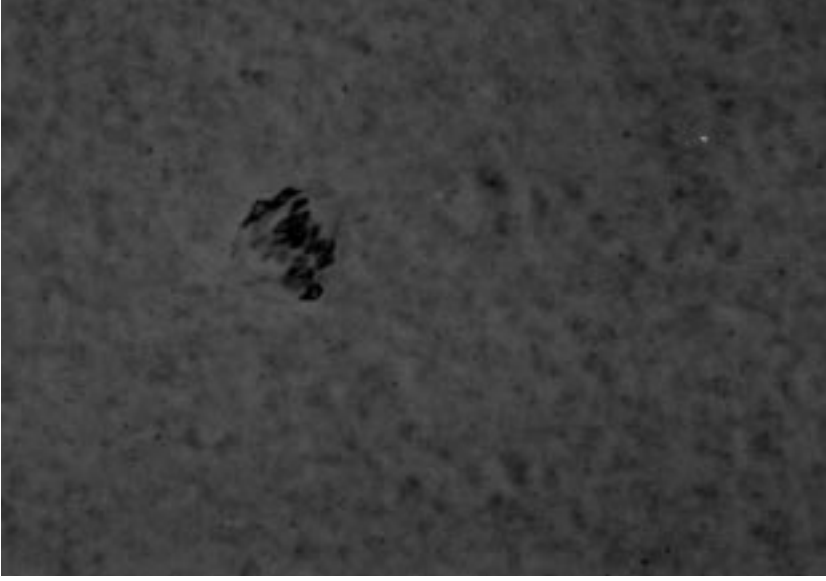


Şekil 5. Germinal vezikül yıkımlanması (GVBD) tamamlanmış, Metafaz I (M I) döneminde bir oosit.

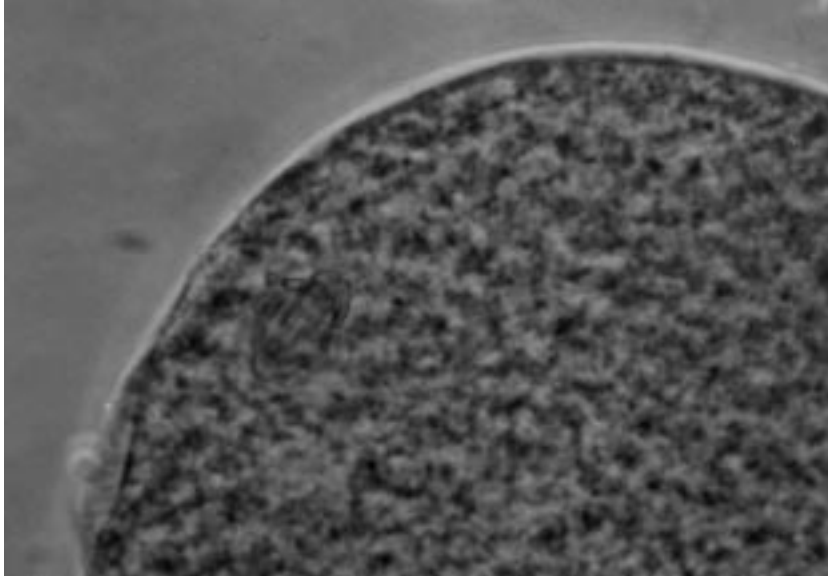
oosit oranları (22, 24 ve 26 saatlik gruplar için sırasıyla %67.3, %78.8 ve %69.8), King ve Linares (14)'in 20-24 saat olgunlaşma ile elde ettikleri orandan (%40) oldukça yüksek bulundu. Çalışmada olgunlaşma gruplarına göre metafaz dönemine (M I + M II) ulaşan oositler gibi, M II'ye ulaşan, yani 1. mayoz bölünmesini tamamlamış olan oositlerin oranları arasındaki farklar da istatistiki açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Çalışmada elde edilen M II oranları, Dominko ve First (2)'ün %75-77, Saeki ve ark. (9)'nin %88-93, Tornesi ve ark. (13)'nin %69, Chian ve Niwa (15)'nin %79~86, Chian ve ark. (16)'nin %82 ve Fukui ve Ono (17)'nin %56-72 olarak saptadıkları oranların oldukça altında gerçekleşti.

Xu ve ark. (21), mezbahadaki kesim anından oosit aspirasyonuna kadar geçen sürenin kısa olması gerektiğini ve bu ön sürenin, germinal vezikülün yıkımı için kritik olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada Tuzla'daki mezbahadan alınan ovaryumların Avcılar'daki laboratuvara getirilmesi ve oositlerin kazanılmasına kadar ≥ 4.5 saatlik bir sürenin geçtiği göz önüne alındığında, nükleer olgunlaşmanın düşük olması bir ölçüde açıklanabilmektedir.

Dominko ve First (2), FSH ile muamelede 1. mayoz bölünmenin tamamlanmasının geciktiğini, bu durumun LH kullanıldığında daha iyi olduğunu bildirmiştir. Sunulan



Şekil 6. M I-Anafaz döneminde bir primer oosit.



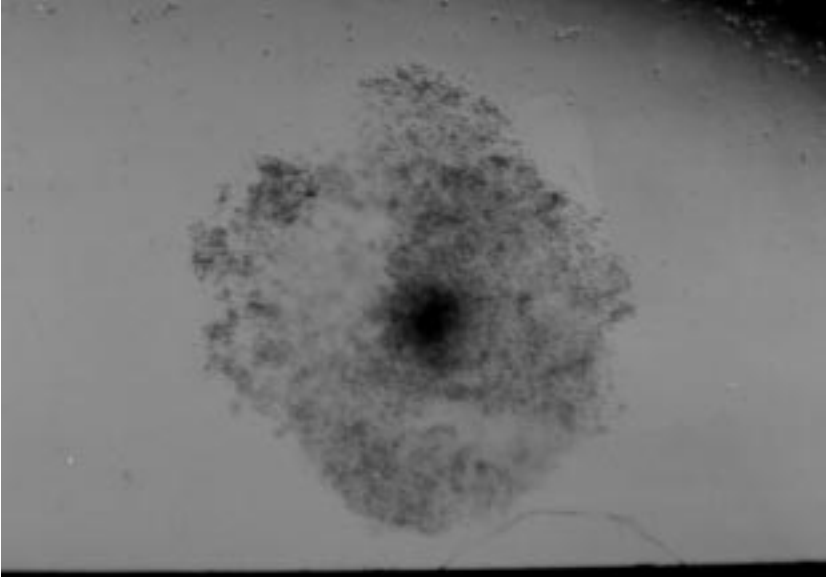
Şekil 7. Telofaz döneminde bir oosit.

çalışmada, olgunlaşma medyumunda LH yerine FSH kullanılmıştır. Bu durumun da sonuçları (az da olsa) etkileyebileceği düşünülmektedir.

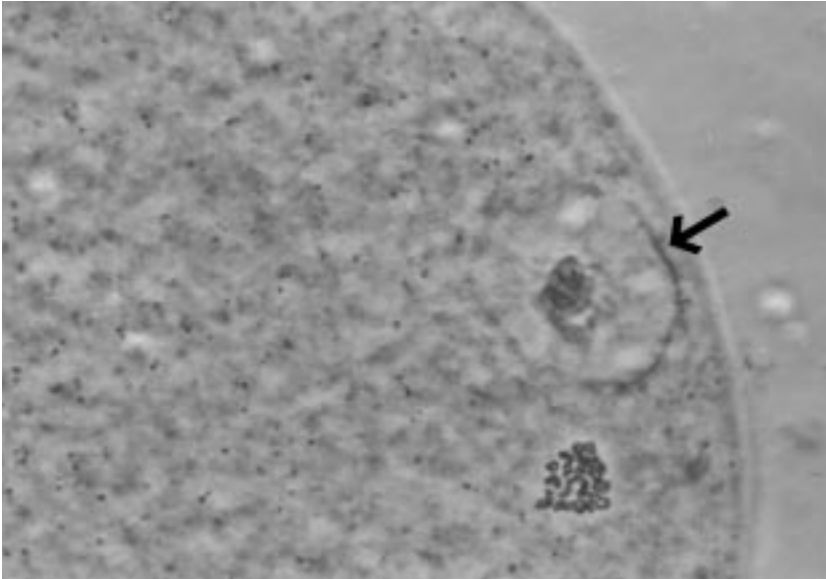
Pinyopummintr ve Bavister (18), in vitro olgunlaştırma esnasında ortamdaki gaz miktarlarının olgunlaşma üzerine etkisini incelemişler ve %5, %10 ve %20 oranında oksijen (O_2) kullandıkları gruplarda M II'ye gelişim oranlarını sırasıyla %9.3, %26.9 ve %71.4 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda anaerob jar içerisinde yapılan kültür işlemlerinde %5 O_2 , %5 CO_2 ve %90 N_2 karışımı ile gazlama yapılmış ve elde edilen M II oranları (%11.5-21.1), Pinyopummintr ve Bavister (18)'in %5 O_2

grubunda elde ettikleri oranının (%9.3) üzerinde iken, aynı araştırmacıların %20 O_2 grubunda saptadığı M II oranının (%71.4) oldukça altında gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar O_2 konsantrasyonunun in vitro olgunlaşma üzerinde oldukça önemli olduğunu göstermiş ve atmosfer havası içinde %5 CO_2 ortamı sağlayan CO_2 'li etüv kullanımının gerekliliğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, 22 saatlik olgunlaşma süresinin sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında yetersiz kaldığı, 24 ve 26 saatlik sürelerin uygulanmasının daha doğru olacağı kanısına varıldı.



Şekil 8. Olgunlaşma sonrası kumulus ekspansiyonu.



Şekil 9. Birinci polar cismini atmış, M II döneminde bir sekonder oosit.
→ Polar cisim.

Kaynaklar

1. Damjanov, I. (1991): Pathobiology of fertilization, embryonic cleavage, and implantation. Monogr. Pathol., 33: 32-55.
2. Dominko, T. and First, N.L. (1992): Kinetics of bovine oocyte maturation allows selection for developmental competence and is affected by gonadotropins. Theriogenology, 37: 203 (Abstr.)
3. Lévesque, J.T. and Sirard, M.-A. (1996): Meiotic resumption is mediated by the accumulation of cyclin B in bovine immature oocytes. Theriogenology, 45: 188 (Abstr.)
4. Sirard, M.A., Coenen, K. and Bilodeau, S. (1992): Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. Theriogenology, 37: 39-57.
5. Xu, K.P. and King, W.A. (1990): The biology of mammalian fertilization and embryo development. AgBiotech News and Information, 2: 25-28.
6. Crozet, N., Szölösi, D. (1979): The effects of Isopropyl-N-Phenylcarbamate on meiotic maturation of mammalian oocytes. Ann.Biol.anim.Bioch.Biophys., 19: 1131-1140.
7. Dominko, T. and First, N.L. (1996): p34^{cdc2} and p33^{CDK2} in regulation of metaphase II arrest in bovine oocytes. Theriogenology, 45: 157 (Abstr.)
8. Fraser, L.R. (1984): Mechanisms controlling mammalian fertilization. Oxford Reviewjs of Reproductive Biology, 6: 174-225.

9. Saeki, K. Leibfried-Rutledge, 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.)
10. 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.)
11. 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.
12. Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Long, C.R., Basile, J.J. and Robl, C.M. (1995): Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes. *Theriogenology*, 43: 202 (Abstr.)
13. Tornesi, M.B., Salomone, D. and Archer, J. (1995): In vitro maturation of bovine oocytes in serum-free medium. *Theriogenology*, 43: 339 (Abstr.)
14. King, W.A. and Linares, T. (1980): Meiosis in post-estrous superovulated and non-superovulated cows. 9th. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Vol.V, Symposia (6-9). Full texts of contributed (short) papers. 16-20 June Madrid-España, 1980.
15. 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.)
16. 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.
17. 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.
18. 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.)
19. 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: 1477-1452.
20. 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.
21. 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.