

ÇİFTLİK HAYVANLARINDA İN VİTRO MATURASYON VE FERTİLİZASYON

(DERLEME)

Fertilization and In Vitro Maturation of Livestock

(A Review)

Serpil SARIÖZKAN¹

¹Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü- ANKARA

ÖZET

Sığır implantasyon öncesi embriyo üretiminde in vitro maturasyon/ in vitro fertilizasyon teknikleri dünyada çoğu laboratuarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda memelilerde genetik ilerleme için kullanılan biyoteknolojik yöntemler hızla gelişmektedir. Bu metodlar, damızlık hayvanlardan daha uzun yıllar oosit elde edilmesine olanak sağlar. Dolayısıyla bu biyoteknolojik yöntemler, hayvansal üretimin çoğaltılmasını mümkün kılmakta ve ekonomiye büyük katkılar sağlamaktadır.

Mezbahalarda kesilen hayvanların ovaryumlarından oositler toplanmaktadır. Bu oositler in vitro mature, fertilize edilebilmekte ve in vitro üretilen embriyolar dondurularak saklanabilmektedir. Embriyolar uygun, cerrahi olmayan tekniklerle alıcılara transfer edilmektedir. Ayrıca IVM/IVF embriyolar nükleer transfer ve diğer gen manipulasyonlarında materyal teşkil etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Oosit, in vitro maturasyon, in vitro fertilizasyon, embriyo

SUMMARY

Techniques for producing bovine preimplantation embryos by in vitro maturation/ in vitro fertilization (IVM/IVF) are being used in many laboratories world wide. There has been a great development in biotechnology recent years. These new methods enable us to obtain oocytes from breedingstock for long years. Therefore these biotechnological methods increase animal productivity and benefit for the economy.

Viable embryos can be produced from ovarian oocytes collected hours after death of animals at the slaughterhouse. By using this technique, oocytes are in vitro matured and fertilized, stored by freezing and embryos suitable for non-surgical transfer can be produced inexpensively in large numbers. Moreover, IVM/IVF embryos can provide the starting materials for nuclear transfer and other approaches for manipulation of genome.

Key Words: Oocyte, in vitro maturation, in vitro fertilization, embryo

1.GİRİŞ

Hayvan yetiştiriciliğinde üremenin denetlenmesi ve yönlendirilmesi için birçok üreme tekniği yöntemine başvurulmaktadır. Bunlar arasında yavru sayısını artırmaya yönelik süperfollikülasyon, süperovulasyon ve embriyo transferi teknikleri sayılabilir. Ancak çalışmaların etkin, daha başarılı ve ekonomik olması için araştırmacılar in vitro fertilizasyon tekniğine yönelmişlerdir.

İn vitro maturasyon (IVM), kapasitasyon, in vitro fertilizasyon (IVF) ve in vitro kültür (IVC) teknikleri temel gamet fizyolojisi ve diğer biyoteknolojik çalışmalara da katkıda bulunmaktadır. İn vitro fertilizasyonun

gerçekleşmesi, erkek ve dişi gametlerin yüksek oranda yaşama gücüne, in vivo ortama eşdeğer in vitro mikro çevre koşullarının oluşturulmasına bağlıdır. Oositlerin olgunlaştırılması ardından fertilizasyonları sırasında ve zigotların kültüre edilmeleri amacıyla kullanılacak mediumlara birtakım iyonların serum konsantrasyonlarına yakın bir düzeyde eklenmesi, mediumların pH ve osmolaritesinin ayarlanması zorunludur. Embriyoların enerji ihtiyaçları laktat, piruvat ve glukoz ile protein ihtiyaçları ise ısı ile inaktive edilen çeşitli kan serumları ile bovine serum albumin (BSA) katılarak sağlanabilir (6,14).

1.1. İn Vitro Fertilizasyonun (IVF)

Tarihçesi

İn vitro fertilizasyona dair ilk çalışmalar Shenk' in kobay ve tavşandan topladığı ovaryum oositlerinin homolog spermatozoa ile döllendiği, ilk polar cisimciğin çıkışı ve kültüre bağlı olarak oositin bölündüğünü not ettiği 1878 tarihine dayanmaktadır. Bu çalışma

1969 yılında Thiboult tarafından özetlenmiştir. Chang 1959' da in vitro fertilizasyonun ilk güvenilir kanıtını in vitro döllenmiş tavşan oositlerinin alıcı tavşana naklini takiben döl elde etmesiyle göstermiştir (18). İn vitro fertilizasyon çalışmalarının tarihsel gelişiminin özeti Çizelge 1.1' de görüldüğü gibidir.

Çizelge 1.1 İlk başarılı in vitro fertilizasyon çalışmaları (Wolf ve Quigley,1984)

Yıl	Canlı Türleri	Araştırmacılar
1878-1958	IVF'da onaylanmamış çalışmalar	Thiboult, tarafından özetlenmiştir.
1959	Tavşan	Chang
1964	Hamster	Yanagimachi ve Chang
1968	Fare	Whittingham
1969	İnsan	Edwards ve arkadaşları
1970	Kedi	Homner ve arkadaşları
1972	Kobay	Yanagimachi
1973	Rat	Miyamoto ve Chang
1977	İnek	İritani ve Niwa
1978	Domuz	İritani ve arkadaşları
1983	Rhesus maymun	Bavister ve arkadaşları
1983	Şempanze	Gould

2. OOSİT MATURASYONU

2.1. Kumulus Oosit Kompleksi

Tam olarak gelişimini tamamlamış bir oositi acellüler bir matrix tabaka olan zona pellucida, korona radiata ve kumulus hücrelerince sarılmıştır. Bu üçlü yapı kumulus oosit kompleksini (COC) oluşturur (14).

2.2. İn Vivo Maturasyon

Ovulasyonla olgunlaşmış fertilize olabilir bir oosit atılmadan önce follükülde birbirini takip eden bir dizi olaylar olmaktadır. Çoğu memeli türlerinde ovulasyon ve follükülün rupturundan birkaç saat önce, oositte mayoz yeniden başlar ve ilk mayotik bölünmenin profazından ikinci mayotik bölünmenin metafazına doğru ilerler. Bu kompleks biyolojik yapı, primer oositte fertilize olma-

mış oosit şekline dönüşür ki bu durum oosit olgunlaşması olarak kabul edilir (9,16,17). İlk mayotik bölünme pubertasa erişinceye kadar tamamlanmaz. Bu basamakta nuklear materyaller zarla çevrilidir ve bu yapı germinal vezikül (GV) olarak adlandırılır (16). Pubertasla beraber oosit kaldığı yerden itibaren mayotik bölünmeye devam eder. Birinci mayotik bölünmenin sonuna doğru ilk polar cisimcik atılır. Oosit hızla 2. mayotik bölünmeye başlar ve çoğu memeli türlerinde ovulasyondan önce 2. metafaza ulaşır. (13).

2.3. Maturasyonun Klasifikasyonu

Follüküler çevreden serbest bırakılan diploten basamağındaki oositlerde uygun kültür koşulları altında mayoz yeniden başlayıp mature olabilirler. Mikroskop altında mayozun yeniden başlamasının en kesin

işaretinin nukleus membranının erimesi yani germinal vezikülün yıkılmasına olduğu, oosit maturasyonu süresince ilk polar cisimciğin atıldığı, ikinci mayotik iplikciklerinin şekillendiği, kumulus hücrelerinde ekspansiyon gözlemlendiği belirtilmektedir (5).

3. İN VİTRO MATURASYON

İn vivo olarak oositler, teka hücrelerinin etkisi altında germinal vezikül basamağında beklerler. Gelişimi durmuş oositlerde maturasyonun devamı, onların folliküler ortamından alınıp gonodotropinler ve steroidlerin etkisi altında in vitro kültüre edilmesiyle sağlanabilir (12). Maturasyon sürecinin ortalarında, yaklaşık kültürün 12. saatlerinde, kumulus hücreleri büyük bir genişleme ve yapışma işaretleri gösterirler. Olgunlaşmanın sonunda, kültürün yaklaşık 24 saat sonrasında, kumulus genişlemesi pik düzeye ulaşır (14).

3.1. Ovaryumların Transportu

Oositler, belirli bir mezbahadan toplanan ovaryumlardan elde edilir. Bu amaçla, tercihan sıcaklığı 30-35°C ye ayarlanmış %0,9 NaCl veya PBS kullanılır. Bu solüsyonları içeren termoslara toplanan ovaryumlar 2-4 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır (4).

Araştırmacılar, ovaryumların, gametlerin fertilizasyon oranlarında ya da in vitro ortamda embriyonun blastosist basamağına gelişim kapasitesinde bir kısalma olmaksızın 25 °C de 8 saate kadar saklanabileceğini, ayrıca 37 °C ya da 4 °C de 4 saat ve üzerindeki saklamaların yaşama kabiliyetlerinde azalmalara sebebiyet vereceğini belirtmişlerdir (6).

3.2. Folliküllerin Büyüklükleri

Ovaryumlar toplandıktan sonra 2 saat içinde, çapları 3-8 mm olan folliküllerinden oositlerin toplanması gerekmektedir. Bu çaplardaki folliküllerden elde edilen oositlerin çoğu immatüre olup, diktiyat basamağında ve germinal vezikül yapısında bekleyen oositlerdir (11). İn vitro maturasyon ve fertilizasyon

yondan sonra 8 hücreli basamağın ilerisine geçmede 2 mm veya daha küçük çaptaki folliküllerden toplanan oositlerin, başarısız oldukları, 8mm' den büyüklerin ise fertilizasyon sırasında yaşlanmış olacağından dolayı blastosiste ulaşmada sorunların yaşandığı bildirilmiştir (14). Kompakt, multibakalı kumulus hücrelerine sahip ve homojen ooplasmalı olan oositler maturasyon için tercih edilmelidir. Kumulus oosit kompleksinin kalitesi, fertilizasyondan sonraki ilerleyen gelişim kabiliyetini ve istenilen bir olgunlaşmayı elde edebilmek için önemli bir faktördür (15).

3.3. IVM'de Kullanılan Mediumlar

Embriyoların in-vitro ortamdaki ihtiyaçları birtakım spesifik farklar göstermekle birlikte genelde birbirlerine benzer. IVM da kullanılan kültür mediumları sadece olgunlaşmayı değil, fertilizasyonu ve daha sonraki embriyonik gelişimi de etkileyecektir (1). Mediumlar arasındaki fark içerdiği iyon ve enerji kaynakları konsantrasyonundan ileri gelmektedir.

Mediumlar genellikle serum, serum albumin ve antibiyotiklerle desteklenmektedir. Kompleks mediumlar basit mediumlara aminoasit, vitamin ve birtakım substanslardan serumda bulunan düzeyde eklenmesiyle hazırlanmaktadır. TCM-199, Ham's F-10, Ham's F-12, Brinters BMOC-3, KRB ve MEM çoğu çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (5).

3. 4. Mediumların Tampon Sistemleri ve Osmolarite

Embriyoların kültüre edildiği mediumun pH'sını ayarlamak ve memeli embriyoları için gereken CO₂'yi sağlayabilmek için CO₂'li inkübatörler kullanılmaktadır. Kullanılacak tüm mediumların, modifiye fosfatla ya da bikarbonatla dengelenmiş tuzlu vasatların pH'larının muhafazası için %5 CO₂ başta olmak üzere %5 O₂, %90 N₂, %100 nem içeren ortamda inkübasyonu gerekmektedir.

Bu mediumlardan hazırlanan mikrodamları içeren (10-20 COC/ 50-100 µl medium) petri kutularının yüzeyi mineral yağ ile kapatılarak CO₂'li inkubatörde bekletilir. Mediumların CO₂ içermeyen ortamda uzun süre kalması durumunda HEPES pH dengeleyicisi olarak kullanılabilir ve NaCl azalarak osmolarite düzenlenebilmektedir. Mediumlara genellikle pH indikatörü olarak 1-20 mg/L kadar fenol red eklenmektedir. Mediumların pH'sı 7-8 arasında değişmekle birlikte en iyi fertilizasyon sonuçlarının pH 7.2 ile 7.8 arasında elde edildiği bildirilmiştir (7). Mediumların pH'sının 7.2-7.4, osmolaritenin ise 285-300 mOsm arasında olması optimal kabul edilir (6,1).

3.5. Hormon İlavesi

İn vitro maturasyon için bir çok medium çeşidi kullanılmaktadır. İn vivo maturasyona eşdeğer hormonal mikro çevre koşullarının yaratılması amacıyla, mediuma özellikle FSH, LH, östradiol 17β ilavesiyle oositlerin yüksek oranda bir yaşama gücüne ve yüksek oranda normal fertilizasyon ve embriyonik gelişime uğrayacağı rapor edilmiştir (6). Gonadotropinler, kumulus hücrelerinin metabolizmasını değiştirerek oositlerde mayozun yeniden başlamasını indükler ayrıca kumulus hücrelerinde spermatozoanın kapasitasyonu için gereken faktörlerin üretilmesini sitümüle ettiği, in vitro fertilizasyon oranını arttırdığı ve pronükleus formasyonunun frekansında belirgin bir şekilde artışa neden olduğu belirtilmektedir. (12).

3.6. Serum İlavesi

Serumun, oosit maturasyonu ve fertilizasyondaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte bazı büyüme faktörleri ve yüksek moleküler ağırlığa sahip proteinleri sağladığı belirtilmektedir. Bunlar sayesinde sığırlarda kumulus ekspansiyonunun oluşumu, oosit maturasyonunun tamamlanması ve normal embriyonik gelişimi sağlanmaktadır (4).

3.7. Granulosa Hücrelerinin İlavesi

Maturasyon mediumuna granüloza hücrelerinin ilavesinin oositlerin sitoplazmik ve nüklear maturasyonlarının tamamlanması ve fertilizasyonun ilerleyen aşamaları için faydalı olduğu bildirilmiştir. Granüloza hücreleri, çapları 10 mm olan antral folliküllerin diseksiyonu, santrifügasyonu ve yıkanmaları ile elde edilmiştir. Yapılarında düşük moleküler ağırlıkta peptidler, epidermal büyüme faktörleri, fibroblast büyüme faktörleri, insülin, steroidler, transferin bulunmaktadır (3).

3.8. Maturasyon Süresinin Etkileri

Yapılan çalışmalarda, oositlerin, in vitro maturasyonu ve in vitro fertilizasyonu için 39°C'de %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ ve %100 nem içeren inkubasyon ortamında 18-27 saatlik inkubasyonunun, optimal penetrasyon oranının elde edilmesi ve mayotik maturasyonun tamamlanması için gerekli olduğunu belirtmişlerdir (14).

3.9. Embriyonik Gelişim İçin Optimum Isı Dereceleri

Sığır embriyo üretiminde 35-39°C lik ısılar maturasyonu etkilememiş olmasına rağmen IVF ve IVC için 39°C'nin optimal olduğu bildirilmiştir. 40°C ve üzeri ısıların ise özellikle IVC ve fertilizasyon zarar verici nitelikte olduğu bildirilmiştir. Koyunlar üzerinde yapılan bir çalışmada maturasyon süresince inkubasyon ısısının düşürülmesinin kromozomal anormalliklere sebebiyet verdiğini göstermişlerdir (6).

4. SPERMATOZOANIN KAPASİTASYONU

Kapasitasyon, spermatozoa yüzey örtülerinin kaldırılması veya değişikliğe uğratılması ve plazma membranının hem ekstrinsik hem de intrinsik komponentlerinin değişimlerini kapsayan fizyolojik, biyokimyasal değişimlerin bütünüdür (2).

4.1. Kapasitasyon Mediumu

Kapasitasyon mediumlarındaki tüm komponentler direkt ya da indirekt olarak kapasitasyona destek vermelidir. Mediumda, spermatozoanın yaşamsal faaliyetlerini destekleyen faktörler bulunmadıkça kapasitasyonun gerçekleşmesi mümkün değildir. Bu faktörler ısı stabil, düşük moleküler ağırlıkta maddelerdir. Bunlar folliküler sıvı, oviduktal sıvı, uterus sıvısı, kan serumu veya adrenal glandın ekstratlarında çok fazla bulunurlar (8). Sperm motilite faktörleri diye bilinen bu faktörlerin glikozominoglikanlar, kateşolaminler (örn epinefrin), heparin, taurin ve hipotaurin olduğu ve bu faktörlerin ısı stabil ve ayrışmayan fraksiyonları sayesinde spermatozoanın in vitro kapasite edilebildiği belirtilmektedir (19).

Glikozaminoglikanlar (GAGs), özellikle heparin, spermatozoayı kapasite etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. GAGs'ın proakrozinin akrozine dönüşümünü uyardığı, uterus ve ovidukt sıvısında da bulunduğu, akrozom reaksiyonunu ve kapasitasyonu indüklediği bildirilmiştir (8). GAGs, dekapasite edici faktörleri spermatozoa üzerinden ayırarak cAMP bağımlı protein kinazı ve fosfolipaz A₂ enzimini aktive ederek hücre içine Ca⁺² iyonunun alınmasını sağlayan spermatozoa membran değişimlerini sağlayarak etki gösterirler (6).

4.2. İn Vitro Kapasitasyon İçin Spermın Hazırlanması

İn vitro fertilizasyon için spermatozoa genellikle tekrarlayan santrifugasyonlarla yıkandıktan sonra seçilir. Spermatozoa, epididimis ve seminal plazmadan gelen protein moleküllerin ve dondurmada kullanılmış olan sulandırıcıların kapasitasyonu engelleyici etkilerini önlemek ve bu maddeleri uzaklaştırmak amacıyla yıkanır. Yüksek motiliteye sahip spermatozoonlar daha sonra santrifüjle biriktirilir ve fertilizasyonda kullanılır (14).

Spermatozoanın kapasitasyonunda heparin, hipotaurin, kalsiyum iyonofor, ovidukt ve follikül sıvıları kullanılmaktadır. Kafeinin boğa spermatozoasında motilite arttırıcı bir etkisi vardır. Kafeinin spermatozoon motilitesini artırarak fertilizasyonu güçlendirdiğini ayrıca akrozom reaksiyonunu ilerletip zonaya penetrasyonu ve vitellin membranda füsyonu sağladığını bildirilmiştir (10).

5. İN VİTRO FERTİLİZASYON

Fertilizasyon kompleks bir olaydır. İki gametin birleşmesi ve somatik kromozom sayılarının yenilenmesi ve yeni bir bireyin gelişimini sağlar. İn vitro fertilizasyonu başarılı olabilmesi için bir takım kriterler gereklidir. Bunlar ;

1. Dişi ve erkek genital kanalında gametlerin fertilizasyon yeteneğinin gelişmesi.
2. Gonadlarda gametlerin nüklear ve sitoplazmik maturasyonun gerçekleşmesi.
3. Hiperaktiviteye sahip dölleyebilir spermatozoonun optimal yoğunluğu. Sığır IVF inde yaygın olarak 500.000- 5.000.000 spp/ml spermatozoon dozu kullanılmaktadır.
4. İlk polar cisimcikli döllenebilir ovumun varlığıdır.

İn vitro fertilizasyonun başarısını, fertilize ovumun alıcı dişiye naklini takiben spermatozoa vericisi erkeğin genetik işaretlerine sahip normal bir yavrunun doğması ispatlamaktadır. Embriyo transferi sonucuyla beraber IVF'nun diğer kriterleri, ooplazma içerisine spermatozoonun penetrasyonu, spermatozoon başının şişmesi, pronüklear formasyon, normal morfolojik bölünmenin gözlenmesi, blastosit formasyonu, embriyoda Y kromozomlarının gösterilmesi, kortikal granüllerin bırakılması ve spermatozoon kuyruğunun ooplazma içerisinde bulunmasıdır. Bu delillerin hiç biri tek başına normal fertilizasyonun olduğuna dair güvenilir bir sonuç vermez (7).

KAYNAKLAR

1. **Bavister BD, Rose-Hellekant, TA, Pinyomi-pummintr, T** (1992) *Development of in vitro matured- in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media*. Theriogenology, 37, 127-146.
2. **Boldt J, Wolf DP** (1984) *Sperm Capacitation*. Chapter 11. In: Human In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Ed. P. D. Wolf; M. M., Quigley. Plenum Press.
3. **Fukui Y** (1990) *Effect of the follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro*. Molecular Reproduction and Development. 26, 40-46.
4. **Fukui Y, Ono H** (1989) *Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage development of bovine oocytes*. Journal of Reproduction and Fertility. 86, 501-506.
5. **Gordon I** (1994) *In Vitro Maturation Culture Systems*, p. 99 –1 06. In : Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International, Cambridge.
6. **Greve T, Madison V** (1991) *In vitro fertilization in cattle*. Reprod. Nutr. Dev. 31, 147- 157.
7. **Hafez ESE** (1993) *Assisted Reproductive technology: ovulation manipulation, in vitro fertilization/ embryo transfer*. p.461-502. In: *Reproduction in farm animals*. 6th Ed. Lea Febiger. Philadelphia.
8. **Kato H, Iritani A** (1993) *In vitro fertilization in cattle*. Molecular Reproduction and Development. 36, 229-231
9. **Motlik J** (1989) *Cytoplasmic aspectes of oocyte growth and maturation in mammals*. Journal of Reproduction and Fertility. Suppl. 38, 17-25.
10. **Pomeroy KO, Dodds JF, F-Seidel GE** (1988) *Caffeine promotes in vitro fertilization of mouse ova within 15 minutes*. Journal of Experimental Zoology. 31,240.
11. **Sanbuissho A, Threlfall WR** (1990) *The influence of serum on IVM and fertilization of bovine oocytes*. Theriogenology. 34, 341-347.
12. **Sanbuissho A, Threlfall WR** (1989) *The effects of oestrus cow serum on the in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte*. Theriogenology. 31, 693- 699.
13. **Schultz RM, Lamarca MJ, Wassarman PM** (1978) *Absulute ratio of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro* . Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 4160.
14. **Shamsuddin M, Niwa K, Rodriguez-Martnez H** (1996) *In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes*. Reprod. Dom. Anim. 31, 613-622.
15. **Suzuki T, Singla SK, Sujata J, Madan ML** (1991) *Cleavage capability of water buffalo follicular oocytes classified by cumulus cells and fertilized in vitro*. Jou. of Veterinary Medical Sci. 53, 475-478.
16. **Thibout C, Szollosi D, Gerard M** (1987) *Mammalian oocyte maturation*. Reprod. Nutr. Dev. 27, 865-896.
17. **Tornell J, Billig H, Hillensjo T** (1991) *Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides*. Human Reproduction. 6: 411-422.
18. **Wolf PD, Quigley MM** (1984) *Histological Background and Essantials for a Program* Chapter 1. In: Human In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Plenum Press, London.
19. **Yanagimachi R** (1988) *Mammalian Fertilization*. P. 135-172. In: The physiology of reproduction. Ed: Knobil E., Neill J. Et. All. Raven Press, New York.