

## SİĞİRLARDA İN VİVO VE İN VİTRO FERTİLİZASYON (DERLEME)

### (In vivo and In vitro Fertilization in Cattle) (A Review)

Numan AKYOL<sup>1</sup>

1: Dr. Veteriner Hekim, Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü

#### ÖZET

Bu derlemede, siğır oositlerinin in vitro ve in vivo koşullarda döllenesmesi ve buna etki eden faktörler hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler :** Siğır, In vivo, In vitro, Fertilizasyon

#### SUMMARY

In this review, about in vivo and in vitro fertilization of bovine oocytes and factors affecting on this procedure were discussed.

**Key Words :** Bovine, In vivo, In vitro, Fertilization

#### GİRİş

In vitro fertilizasyon yöntemiyle siğır embriyosu elde edilmesi üzerinde yıllardır çalışılmaktadır. Ancak yeterli düzeyde başarı sağlanması konusunda bazı endişeler mevcuttur. Bu tür endişelerin yok edilmesi, oositlerin, maturasyon, döllene yetenekleri ile spermatozoonların, kapasitasyon ve dölleme kabiliyetlerinin ayrıntılı olarak ortaya konmasına bağlıdır. Bu derlemede konuyla ilgili araştırıcılara faydalı bilgiler sunulmaya çalışılmıştır.

#### Spermatozoa Kapasitasyonu

In vitro embriyo üretiminde özellikle spermatozoa kapasitasyonu ve oosit maturasyonu aşılması gereken iki önemli ve zor basamaktır. Bütün memeli türlerinde, spermatozoa dişi genital kanalına bırakıldığı anda fertilizasyon yapabilme yeteneğinde değildir. Bundan dolayı fertilizasyona hazırlık sürecinin geçirilmesi gerekir. Bu süreç; maturasyonu, başlangıçtaki membransel değişimleri yani kapasitasyonu ve ardından akrozom reaksiyonunu kapsar. Kapasitasyon, spermatozoonların ovum içerisine girebilmek için gerekli akrozom reaksiyonuna yol açacak, fizyolojik ve biyokimyasal olayların tümü olarak tanım-

lanır. Uterus, ovidukt ve ovulasyon esnasında folliküler sıvı dahil kapasitasyonda görev alırlar (21, 31).

Kapasitasyon türe özgü olmayıp, boğa spermatozoonları tavşan uterusunda, keçi spermatozoonları domuz uterusunda, tavşan spermatozoonları rat ve köpek uterusunda kapasite olabilmektedir. Hatta kapasitasyon organa özgü de değildir. Tavşan spermatozoonları kolon ve idrar kesesi, vezikula seminalis ve gözün anterior kamarasında bile kapasite edilmiştir. Kapasitasyonun başladığı ve tamamlandığı yer türe göre farklı olmakla birlikte kapasitasyonun asıl gerçekleşme yeri oviduktur (22, 24).

Spermatozoonlar mayozu tamamlayıp testisten ayrıldıktan sonra vaz efferent ve proksimal epididimise geçerler. Kapasitasyondan önce spermatozoonların mature olmaları gerekir. Spermatozoonlar maturasyon aşamasını, türe bağlı olarak değişmekle birlikte, 2-10 gün arasında kaldıkları epididimal kanalda büyük oranda tamamlarlar. Epididimal kanalda kaldıkları süreç içinde spermatozoonların, motilite, türe özgü oosit tanımlama bilgisi, zona pellusidaya penetre

olma ve bağlanma yetenekleri gelişir. Sitoplazmik damlacığın ve akrozomun epididimal plazma ile sarılmasıyla gelişen morfolojik değişimleri, kromatin ve diğer organellerin disülfid bağları etkisiyle yapısal stabilizasyonu gibi pek çok biyokimyasal değişimler geçirirler. Spermatozoa membranlarının biyofiziksel değişimleri maturasyon olgusu içinde yer almaktadır. Spermatozoonlar, ejakülasyon sonrası seminal plazmadaki enerji veren faktörler sayesinde maturasyonunu tamamlarlar (22, 29).

Spermatozoonlar, maturasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu sürecinden geçmeden fertilizasyon yeteneği kazanmazlar. Maturasyon olgusunda en önemli faktör epididimal salgılardır. Kapasitasyon olgusunu ilk kez, 1951 yılında Chang ve Austin bildirmişlerdir (14).

Fertil boğa, çiftleşme esnasında bir kaç milyardan fazla motil spermatozoonu dış genital kanalına bırakır. Spermatozoonların genital kanal boyunca yolculukları esnasında çok güçlü bir seleksiyon süreci işler. Çünkü bu göç sırasında çok sayıda spermatozoon ölür veya fagosite edilir. Yalnızca birkaç bin canlı spermatozoa oviduktun kaudal isthmus bölgesine gelerek burada bir spermatozoon deposu oluştururlar. Buradan çıkacak fertilizasyon yeteneği en iyi spermatozoonlar oositle temasa hazır olurlar. Dış genital kanalında, kapasitasyondan sorumlu olduğu bilinen, glikozamino glikanlar (GAG) kondroitin sülfatlar ve heparin benzeri maddeler mevcuttur (33).

Kapasitasyon sırasında en önemli faktörlerin başında plazma steroid düzeyi yani östradiol/progesteron oranı gelir. Ovulasyonun ardından ovulasyon çukurluğunda luteinizasyon başlar ve sonraki 5-6 günde serum progesteron seviyesi ancak 1 ng/ml düzeyinde kalır. Fertilizasyon ve gametlerin genital kanalındaki göçleri süresince gelişebilecek östradiol-progesteron dengesizlikleri, gamet transportunda aksamalara ya da erken embriyonik ölümlere neden olmaktadır. Plazma steroid dengesizliği oluşturan sebeplerin en başında

süperovulasyon amaçlı hormon uygulamaları gelmektedir. İkinci önemli faktör ise, genital kanaldaki O<sub>2</sub> yoğunluğudur. Memelilerin genital kanalında bulunan sıvılardaki O<sub>2</sub> miktarı ovulasyon zamanı dışında oldukça düşüktür. Ovulasyon sırasında bu miktarın artması ile oluşan serbest oksijen reaktifleri (Reactive oxygen species-ROS) spermatozoa hayatyeti ve kapasitasyonu bakımından önemlidir (23, 37).

Memelilerde fertilizasyondan hemen önce spermatozoonlar yüksek oranda motilite gücüne ulaşırlar. Bu durum spermatozoonun fertilizasyon yeteneğinin kritik bir ölçütüdür. Çünkü fertilizasyonun tamamlanabilmesi için spermatozoonun geçmek zorunda olduğu, kumulus hücre katmanı, zona pellusida ve ooplazma membranı gibi üç önemli engel vardır. 1969 yılında ilk kez Yanagimachi tarafından bildirilen ve spermatozoonların hiperaktivasyonu olarak tanımlanan bu olayda folliküler sıvının büyük rolü vardır. Ca<sup>++</sup> iyonlarının spermatozoa akzonomuna gelmesiyle hücre içi cAMP miktarı artar böylece motilite artırılmış olur (7).

### **Akrozom Reaksiyonu**

Akrozom, spermatogenezis sırasında golgi kompleksinden gelişen nukleusun hemen hemen yarısını örten hyaluronidaz ile proakrozozin enzimi içeren bir organeldir. Kapasite olmuş spermatozoa kumulus ooforus (kumulus ve korona radiata hücreleri) ile teması esnasında akrozom reaksiyonuna uğrar. Bu esnada akrozomun posterior kısmı ekvatoryal segment dışında plazma membranı ile, dış akrozomal membran da birçok noktada birbiriyle birleşerek küçük veziküller şekillendirirler. Bu veziküller arasındaki boşluklardan akrozomal içerikteki enzimler dışarı çıkar. Reaksiyon sonunda akrozom tümüyle parçalanır ve spermatozoon başı yalnızca iç akrozomal membranla sarılı olarak kalır (30).

Akrozom reaksiyonu sonucu serbest kalan, özellikle hyaluronidaz gibi enzimler, kumulus ooforus hücrelerini birbirine bağlayan ve bir hyaluronik asit kompleksi olan bağları

eritir. Bu arada motilitesi artmış olan spermatozoonun aktif kuyruk hareketleri yardımıyla bu hücreler geçilmiş olur. Akrozom reaksiyonu, hücre dışında bulunan  $Ca^{++}$  yardımıyla başlatılır. Akrozom içine alınan  $Ca^{++}$ , proakrozini aktif formu olan akrozine dönüştürür. Akrozin ile birleşmiş plazma membranı ve dış akrozomal membranın çeşitli noktalardan eriyip parçalanmasına neden olur. Bu parçalanma sonucu akrozomal enzimler de serbest kalır. Bu iyonların olmaması durumunda kapasitasyon sekteye uğrar. Akrozom reaksiyonunun oluşum mekanizmasında, monovalan ve divalan katyonlar rol almaktadır. Özellikle bu aşamada ovidukt ampullasında monovalan katyonlardan  $Na^+/K^+$  oranının artması, spermatozoa kapasitasyonunda önemli regülatör görevleri olduğunun işaretidir. İn vitro spermatozoa kapasitasyonunda,  $O_2$  ve cAMP düzeyinde spesifik bir artış gözlenmektedir (12).

Spermatozoon kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu, inekte altı saat içinde tamamlanır. Bu arada östradiol etkisiyle ovidukt silier hücreleri uyarılmış olduğundan, bunların aktivasyonları ile ovum ritmik olarak oviduktun alt kısımlarına doğru ilerletilir ve kumulus hücrelerinin çoğunu kaybeder (19).

Boğalarda, normal koşullarda kapasitasyonun engellenmesine yarayan ve seminal plazmada bulunan dekapasitasyon faktör, spermatozoa yüzey antijeni ve akrozom stabilizatörü olan akrostatin mevcuttur.  $Ca^{++}$  iyonlarının spermatozoon içerisine girmesine seminal plazma içindeki bazı bioaktif maddeler engel olur. Akrozom reaksiyonunda ekstrinsik faktörler ise, sıcaklık, pH, magnezyum ve albumindir. İn vitro fertilizasyonda en uygun sıcaklık dereceleri  $37-39^{\circ}C$  olduğu bildirilmektedir (17). Akrozom reaksiyonunda görev alan enzimler Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Akrozom reaksiyonunda görev alan enzimler (29)

Hidrolitik enzimler	Proteolitik enzimler
Asit fosfataz	Arilaminidaz
Ariilsülfataz	Akrolizin
Fosfolipaz A	Kollagenaz (Peptidaz benzeri)
$\beta$ -Glukuronidaz	Katepsin D (Proteaz benzeri)
$\beta$ -N-asetilglukozaminidaz	Nöraminidaz

### Fertilizasyon

Akrozomdan enzim karakterli aktif maddelerin serbest kalması spermatozoon ve zona pellusida arasındaki penetrasyonun şekillenmesi açısından zorunlu bir gelişmedir. Zona pellusida pek çok memeli türünde üç farklı glikoproteinden oluşur. Bunlar; Zona pellusida glikoprotein 1, 2 ve 3 tür (ZP1, ZP2, ZP3). ZP3'ün spermatozoonla zona arasındaki bağın oluşmasında diğerlerine göre daha etkin olduğu kabul edilir ve bu işlem, türe özel olarak gerçekleşir. Zona pellusidayı geçen spermatozoon perivitellin boşluğu da kısa sürede geçerek ovuma yaklaşır. Spermatozoon başı ovuma ulaşır ulaşmaz, ovum yüzeyinde bulunan çok sayıda mikrovillus tarafından sarılır. Plazma membranları arasında birleşme

devam ederken aktif kuyruk hareketleri ile kuyruğun tamamı perivitellin boşluğa girer. Plazma membranı (oolemma) ile temas ve penetrasyon oositte ikinci mayoz bölünmeyi tetikler ve oositin bölünmesini tamamlayıp ikinci polar cismi de atmasıyla, oosit tam olarak fertilizasyona hazır hale gelmiş olur. Spermatozoonun ooplazma içine girmesinin ardından pronükleer formasyon ve singami gelişir (6).

Spermatozoonun ooplazmaya girişiyle birlikte, nükleusu çevreleyen membran parçalanır ve kromozomların dekonduksiyon süreci başlar. Bu arada spermatozoonun orta ve kuyruk kısmı baştan ayrılır ve baş kısmının

etrafını ovum sitoplazmasından köken alan yeni bir membranla sarılarak erkek pronukleusu oluşturulur. Bu olaylarla eş zamanlı olarak ikinci kutup cismini atan ovumda kromozomların etrafı, erkek pronukleus oluşumundaki gibi sitoplazmik bir membranla çevrilerek dişi pronukleusu şekillendirilir. Pronuklear formasyon oluşuktan sonra her iki pronukleus ooplazma içinde merkeze doğru göç ederler. Buluşmanın ardından pronukleus membranları erir erkek ve dişi kromozom grupları birleşerek singami oluşturulur. Singaminin oluşumuyla fertilizasyon aşaması tamamlanır (14, 24).

Elektron mikroskopik incelemelerde, in vitro ortamda spermatozoonla oositin buluşmasının ardından, kapasite spermatozoonun kumulüs hücrelerini geçip zonaya ulaşması ve penetrasyonun başlaması 5 dakika içinde, oolemma penetrasyonunun da 20 dakika içinde gerçekleştiği görülmüştür. Ayrıca penetrasyonun gerçekleştiği oositlerin, %80'in de mayoz bölünmenin 45 dakika içinde tamamlanıp, bunlardan %96'sının 60 dakika sonra ikinci telofaza ulaştığı bildirilmiştir (35).

## Polispermi ve Polispermi Bloğu

Dişi ve erkek cinsiyet hücrelerinin birleşerek zigot oluşturmaları için her birinin haploid (n) sayıda kromozoma sahip olması gerekir. Birden fazla spermatozoonun oosit ooplazmasına ulaşmasına, poliploidi veya polispermik fertilizasyon denir (15).

Polispermik zigot oluşumunda blastosist aşamasına kadar gelişim olursa da, daha ileri aşamalara geçiş gözlenmez. İn vivo fertilizasyonla karşılaştırıldığında, in vitro fertilizasyon prosedüründe, oositin daha fazla sayıda spermatozoonla daha uzun süreli birlikteliği söz konusudur. Bu da doğal olarak yüksek oranda polispermik fertilizasyona neden olmaktadır. İnek oositlerinde, polispermik fertilizasyon oluşumunun en önemli nedenlerden biri gecikmiş veya yetersiz kortikal granül oluşumudur. Ovidukt sıvısının, %10, %30 veya %100 derişimde maturasyon mediumuna katılması, in vitro fertilizasyon oranında düşmeye neden olmaksızın polispermiyi büyük oranda engellemektedir. Oositin, COC olup olmaması, in vitro fertilizasyon oranını değiştirmemekte, yalnız oositin kumulüs hücrelerinden yoksun olması durumunda, polispermi önemli ölçüde yüksek bulunmaktadır. (8, 25).

Polispermik fertilizasyon şekillenmesi, kapasitasyon mediumunun içeriğine, kapasitör ajanların yoğunluğuna, fertilizasyon için yapılan inkubasyon süresine ve spermatozoa konsantrasyonuna önemli ölçüde bağlıdır. Spermatozoon yoğunluğu, inkubasyon zamanı ve kapasitör ajanlardan heparinin dozunun artırılması hem fertilizasyon oranını hem de istenmeyen düzeyde polispermik fertilizasyon oranını artırır (29). En uygun fertilizasyon süresi konusunda yaygın olarak düşük spermatozoon oranı ile uzun inkubasyon süresi, yüksek spermatozoon yoğunluğu ile de kısa inkubasyon süreleri bildirilmiştir (3, 12).

İlk spermatozoonun zonayı geçmesiyle birlikte zona reaksiyonu meydana gelir. Bunun için oositin salgılanan kortikal granüllerin içerdiği enzimler, önce dört sülfatlı gliko-

**Şekil 1.** Fertilizasyonun şematik görünümü

protein yapıda olan ZP2'yi ZPα'ya dönüştürür. Daha sonra ZP3 modifiye olur. Arkasından zona pellusida yüzeyinde mevcut olan spermatozoa bağlayıcı reseptörler inhibe edilir ve diğer spermatozoonların zonaya tutunmaları engellenir. Bu olaya polispermi (zona) bloğu adı verilir (12).

Memelilerin büyük çoğunluğunda zona, tek spermatozoonun plazma membranına ulaşmasına izin verir (Monospermi). Bu olayda kortikal granüller ve zona pellusida aktif olarak rol alırlar. Enzimatik faktörler yardımıyla zonayı eritilmiş oositte farklı türlerin spermatozoonları ile in vitro fertilizasyon mümkün olabilmektedir. Bu yöntemle birden çok spermatozoonun perivitellin boşluğa girmesine rağmen ancak bir tanesinin vitellusa girebildiği gözlenmiştir. Bu olay da, ayrıca vitellus bariyeri varlığını kanıtlamaktadır. Memeli oositi yaşlandıkça polispermi bloğu oluşturma yeteneği zayıflamaktadır (21). Goto ve arkadaşları (13), farklı boğa spermeleri ile yaptıkları in vitro fertilizasyon çalışmalarında, % 9-17 arasında polispermik fertilizasyon oranı bildirmişlerdir.

#### **Glikozaminoglikanların İşlevleri**

Glikozaminoglikanlar (GAG), organizmanın en karmaşık yapısal özelliğine sahip biyokimyasal elemanlarıdır. Heparin, heparan sülfat, kondroitin sülfat, dermatan sülfat, hyaluronik asit ve keratan sülfat başlıcalarıdır. GAG'lar spermatozoa kapasitasyonunda oldukça etkin elemanlar olup, follikül içerisinde bolca bulunmaktadır. Ovulasyonla birlikte oviduktun ampulla bölgesine kadar ulaşırlar. Dişi genital kanalında, GAG'ların steroid hormonlarca denetlenen bir üretim şekli söz konusu olup, anteriordan servikse doğru önemli ölçüde üretimi ve yoğunluğu düşer. İnekte, östrus döneminde üretimi artan GAG'ların luteal fazda seviyeleri oldukça düşer. GAG'ların düşük yoğunlukları spermatozoa kapasitasyonunu uyarırken, yüksek seviyeleri tam tersi etkidedir. Seminal plazmada GAG yoğunluğu 1mg/ml'nin üzerindedir ve bu miktarı kapasitasyonu inhibe eder. Kapasitasyon yapma özelliğinden dolayı,

uterus, ovidukt ve folliküler sıvı kaynaklı içerikler kapasitasyon amacıyla kullanılmaktadır. Heparin, sitozolik Ca<sup>++</sup> ve pH miktarını yükselterek spermatozoa membran proteinlerinin başkalaşım geçirmesini sağlayarak kapasitasyona yardımcı olurlar (12).

#### **İn vitro Fertilizasyona Etki Eden Faktörler**

##### **Sperm Hazırlama Metotları**

İn vitro fertilizasyonun başarılı olabilmesi için, spermatozoonun kumulus hücrelerinden geçerek, ooplazma içine girmesi ve erkek pronukleusun oluşum sürecine kadar olan fizyolojik ve biyokimyasal bütün aşamaları kusursuz bir şekilde tamamlaması gerekir. Dolayısıyla uygun motilite ve yoğunlukta spermatozoonların hazırlanması zorunludur. İn vitro fertilizasyonda kullanılacak spermalar, yıkama, dilüsyon ve preinkubasyon işlemlerinden geçirilir. Spermanın yıkanması, 1800 rpm devirde, 2-3 kez, 5-10 dakika süreyle yapılır ve her defasında süpernatant yani seminal plazma ve kriyo-protaktanlar uzaklaştırılır. Bu işlemlerin ardından boğa spermatozoonları BSA ile zenginleştirilmiş preinkubasyon mediumu içinde inkubasyona alınır (29).

İn vitro fertilizasyon amacıyla taze ve dondurulmuş boğa spermaları kullanılabilir. Spermatozoonların uygun motilitede elde edilmesi için geliştirilmiş birkaç sperm hazırlama yöntemi mevcuttur. Bunların en yaygın olarak kullanılanları; swim-up, percoll density gradient, sephadex ve BO ile direkt yıkama yöntemleridir. Bunların yanı sıra, hyaluronik asit ve spermatozoonların filtrasyonu esasına dayalı metotlar da vardır. Bütün tekniklerde ana gaye motil spermatozoa oranını artırmaktır. Ancak bu esnada membran hasarlarının oluşması da kaçınılmaz bir durumdur. Membran hasarlarının gelişmesi nedeniyle, akrozomal ve sitosolik enzimlerin zamansız serbest kalmaları söz konusu olmaktadır. İnek oositlerinin in vitro fertilizasyonunda adı geçen olumsuzluklardan dolayı pek çok laboratuvar da, normalin çok üstünde (10<sup>6</sup>) spermatozoa ile uzun süreli (20-24 saat) inkubasyon tercih edilir (10, 37).

## Spermatozoa Kaynağı

İn vitro fertilizasyonda kullanılan boğaların fertilizasyon yetenekleri arasında fark olduğuna dair değişik bildirimler vardır. Örnek olarak, güçlü iyonik sıvıların (High Ionic Strength Medium-HIS) ve farklı boğa spermalarının kullanıldığı bir çalışmada, %14-46 arasında farklı fertilizasyon bulgusu elde edilmiştir. BO mediumu ile direkt yıkama tekniğinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise %51.5 ile %77.4 arasında bölünme oranı elde edilmiştir. Bazı araştırmacılar ise, farklı boğa spermaları ile in vitro fertilizasyon başarısının %13 - %94 arasında gerçekleştiğini bildirmektedirler (10, 23, 28, 38).

Boğalardaki bireysel farklılıklar, mevsime, yaşa ve ejakulat kalitesine bağlı olabilir. Ayrıca farklı boğalara ait spermaların içerisinde bulunan dekapasitasyon faktör yoğunlukları da farklı olmakta yani seminal plazma kaynaklı düşük oranda fertilizasyon yeteneği ortaya çıkmaktadır (1, 20). Bazı boğaların spermalarının in vitro fertilizasyon yeteneğinin düşük olması, seminal plazmaya ve in vitro koşullarda spermatozoa yoğunluğunun ani düşüşüne bağlanmıştır (13, 20, 37).

## Fertilizasyon Mediumu ve Kapasitör Ajanlar

Fertilizasyon amacıyla kullanılan medium, oosit ve spermatozoonların en uygun biçimde penetrasyonuna imkan verecek düzeyde bir bileşime sahip olmalıdır. İn vitro fertilizasyon amacıyla taze veya dondurulmuş boğa spermaları kullanılmakla birlikte, dondurulmuş sperma kullanımı daha yaygındır. Taze sperma kullanılması durumunda, uzun kapasitasyon süresi gerekir. Fertilizasyon işleminden önce kısa süreli hipertonic uygulamanın ardından heparin içeren mediumlarda işlem tamamlanabilir. Kafeinli veya kafeinsiz kalsiyum iyonofor sistemlerde bu amaçla kullanılabilirler. Percoll yönteminin kullanıldığı durumlarda, hipotaurinli veya kafeinli inkubasyon sürecinde taze spermatozoa yeterli düzeyde kapasite olmaktadır. Ayrıca kalsiyum içermeyen Tyrode'nin Albumin Laktat Piruvat

mediumu (TALP) içerisinde 4-8 saat inkubasyonu takiben BSA'lı solusyonla yıkama işlemi de olumlu sonuç vermektedir (5, 26).

Dondurulmuş boğa spermalarının in vitro fertilizasyon amacıyla kullanıldığı durumlarda, daha iyi kapasitasyon elde edilir. Bu amaçla, 10 µg/ml heparin katılmış solusyon içerisinde 15 dakika inkubasyondan yaygın olarak yararlanılmaktadır. Swim-up yönteminin ardından 100 µg/ml heparin kullanılması, aynı inkubasyon süresi içerisinde daha iyi sonuç vermektedir. 20 mg BSA/ml, 5mM/ml kafein ve 10 µg /ml heparin içeren Brackett ve Oliphant (BO) mediumu, kapasitasyonda %68 penetrasyon oranı ile iyi sonuç vermektedir. Bu oran yalnız kafeinin kullanıldığı durumlarda %32, yalnız heparinin kullanıldığı durumlarda ise %35'tir (5).

Boğa spermatozoonlarının, in vitro kapasitasyonu amacıyla çeşitli medium katkıları kullanılmaktadır. HIS, GAG'lar, taurin, hipotaurin, heparin, kafein, epinefrin, penisilamin, sığır follikül sıvısı (bFF) ve ovidukt sıvısı, kalsiyum iyonofor (A23187), BSA, lipozomlar, TEST yolk gibi pek çok kimyasal ve biyolojik katkı maddesi bu amaçla kullanılmaktadır (1, 36).

İn vitro fertilizasyon mediumuna inek oviduktundan elde edilmiş epitel hücreleri (Bovine oviductal epithelial cells-BOEC) katıldığında, bu epitel hücrelerin, heparin benzeri moleküller ürettiği ve spermatozoa kapasitasyonuna yardımcı olduğu bildirilmiştir. Ancak konu edilen epitel hücrelerinin ürettiği moleküllerin kapasitasyon mekanizmasının, ovidukt sıvısı ve heparinden farklı şekilde geliştiği kaydedilmektedir. BOEC'in, östrus siklusunun hangi evresinde alındığının spermatozoa kapasitasyonuna etkisi pek yoktur ancak erken luteal safhada alındığı zaman daha etkili olduğu bildirilmiştir (27, 34).

Glukoz, heparinin boğa spermatozoonlarını kapasite etme yeteneğini kısıtlamaktadır. Glukozun bu özelliği dikkate alınarak, bazı

laboratuvarlarda fertilizasyon mediumularına glukoz katılmamaktadır (1,18).

Spermatozoonlarla oositin birlikte inkube edilmesi amacıyla TCM-199, Ham's F-10, Ham's F-12, BO, SFR 199-2, Waymouth mediumu gibi çok sayıda kültür ortamından yararlanılmaktadır. Kültür ortamları çoğunlukla ECS, FSH, LH, bikarbonat, piruvat, laktat ve antibiyotik ilave edilmek suretiyle kullanılırlar (5, 33).

İn vitro fertilizasyon tekniğinin yeni uygulanmaya başladığı yıllarda laboratuvar hayvanları in vivo kapasitasyon amacıyla kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Farklı türdeki çiftlik hayvanlarının da boğa spermatozoonlarının in vivo kapasitasyon ve fertilizasyon

kültürü için kullanılabileceği vurgulanmıştır (16).

### Fertilizasyon Süresi

İn vivo koşullarda dişi genital kanallarındaki sekretorik ve biyokimyasal durum spermatozoonların kapasitasyon ve fertilizasyon yeteneklerini belirleyen en önemli unsurdur. İn vitro kapasitasyon ve fertilizasyonun başarısını, mediumun heparin yoğunluğu ve spermatozoonların heparine maruz kaldıkları zaman periyodu belirler (Tablo 2). İn vitro koşullarda 4 saat heparine maruz kalan spermatozoonlar mature oositle fertilizasyona alındıklarında yeteri derecede oosit penetrasyonu sağlamaktadırlar (11). Bazı araştırmacılar ise in vitro fertilizasyon amacıyla 16-21 saat arasında inkubasyon süresini önermektedir (9).

**Tablo 2.** Heparin dozu ve inkubasyon periyodunun fertilizasyona etkisi (9)

Heparin dozu( $\mu\text{g/ml}$ )	Fertiliz. oranı (%)	Polispermi oranı (%)	İnkubasyon süresi (dk)	Fertiliz. oranı (%)	Polispermi oranı (%)
0	3.4	0	0	38.4	4.0
5	21.7	1.5	5	42.5	3.2
10	35.0	0.8	15	49.0	2.2
25	53.1	2.4	30	44.2	2.6
50	57.2	5.1	45	44.2	4.8
100	58.5	3.4	60	30.8	1.2
200	44.2	3.6	120	35.5	2.0

### Sperm Doze Edilmesi ve Kültür Süresi

İnek oositlerinin in vitro fertilizasyonu amacıyla yaygın olarak dondurulmuş ve çözündürülmüş boğa sperması tercih edilmektedir. İn vitro koşullarda bir oositin fertilizasyonu için ortamda en az 5000 fertil spermatozoon olmalıdır. Ayrıca spermatozoa yoğunluğu, kapasitör ajanların miktarları ve inkubasyon süresi de

fertilizasyon ve polispermi oranı üzerinde önemli ölçüde etkilidir (Tablo 3). İn vitro fertilizasyon laboratuvarlarında yaygın olarak oosit başına  $10 \times 10^3$  ile  $20 \times 10^3$  arasında spermatozoon olacak şekilde fertilizasyon ortamı hazırlanır (12, 29, 37).

**Tablo 3.** Spermatozoa yoğunluğunun ve inkubasyon süresinin in vitro fertilizasyona etkisi (29).

Boğa		Fertilizasyon oranı (%)			
		I		II	
Spermatozoa Yoğunluğu ( $\times 10^6$ )		18.75	12.5	18.75	12.5
İnkubasyon süresi (Saat)	4	61.5	68.4	93.3	23.1
	5	64.0	55.6	80.0	85.7
	6	85.7	52.1	94.4	60.0
	8	84.6	82.4	84.2	89.5
	17	95.2	85.3	--	100.0

### Çevresel Gaz ve Sıcaklık Faktörü

Oosit maturasyonu ve embriyo kültüründe olduğu gibi %5 CO<sub>2</sub>, hava ve yüksek oranda nem bileşimi veya %5 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub>, %90 N<sub>2</sub> ve yüksek oranda nem içeren inkubasyon ortamları kullanılmaktadır. Ortam

sıcaklığı olarak 37-39°C arasında en uygun fertilizasyon oranı elde edilmektedir (12). İnkubator ortamındaki oksijen yoğunluğunun cleavage ve embriyo oluşumuna etkisi Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** İnkubasyon ortamındaki O<sub>2</sub> yoğunluğunun cleavage ve embriyo oluşumuna etkisi (32)

O <sub>2</sub> Yoğunluğu (%)	Bölünme oranı (%)	Morula oranı (%)
2.5	77.7	32.7
5	78.3	40.0
7.5	81.6	36.9
10	80.1	34.8
15	78.3	27.2
20	77.2	22.3

### In vitro Fertilizasyon Ölçütleri

Shioya (29)'ya göre, in vitro fertilizasyonun belirlenmesi için önemli ölçütler şunlardır;

1. Ooplazma içinde spermatozoon kuyruğunun saptanması
2. Spermatozoon başının ooplazma içerisinde görülmesi
3. Erkek ve dişi pronükleusların ooplazma içinde varlığı
4. Birinci ve ikinci polar cisimlerin saptanması
5. Zona pellusida veya perivitellin boşlukta spermatozoon varlığı
6. İkinci mayoz bölünmenin telofaz aşamasının yani oosit aktivasyonunun tespiti.

Perivitellin boşlukta çift polar cismin görülmesinin, bölünmelerin başlangıcı (cleavage) ve kortikal granüllerin kaybolması, fertilizasyon ölçütü olarak kullanılmaktadır (4).

### Partenogenetik Bölünmeler

In vitro üretim embriyolardan elde edilen gebelik oranlarının düşük olmasının bir nedeni de partenogenetik bölünmelerdir. Partenogenetik bölünme, spermatozoonlara ihtiyaç

olmaksızın oosit nükleusunun aktive olması ve bölünmeye başlaması durumudur. Hem in vivo hem de in vitro koşullarda partenogenetik bölünmeler görülür. In vitro maturasyondan sonra inek oositleri kendinden bölünmeye başlayabilirler. Bu normal dışı bölünmeler, kültür mediumlarının biyolojik ve kimyasal bileşimine, spermatozoonlarla inkubasyon süresine bağlıdır. Partenogenetik bölünmelerin izlendiği bir çalışmada, en yüksek partenogenetik bölünme oranı, BSA içeren TALP mediumunda 24 saat inkube edilen oositlerde %46.9 olurken; en düşük oran ise değişik miktarlarda Foliküler sıvı (FF) içeren mediumlarla inkubasyonda % 3.9-4.5 arasında bulunmuştur (2). Sığır embriyolarının kültürü amacıyla, yaygın olarak kültür petripleri içerisindeki mikrodamlara (microdrops) yerleştirilerek üzerlerine embriyotoksik etkide olmayan sıvı parafin veya mineral yağ kapatılır. Mineral yağ, embriyo kültür mediumuyla kimyasal ilişkiye girmeyen, bileşik oluşturmayan ve ortamda erimeyen yani kültür ortamının bileşimini bozmayan bir yapıdadır. Mineral yağın, medium pH'sının değişmez tutulması, mikroorganizma kontaminasyonunu ve buharlaşmayı önleme gibi önemli görevleri vardır (10, 12).



## KAYNAKLAR

1. **Abdoon ASS (2003).** *Factors affecting in vitro production of bovine embryos.* Erişim: <http://esarf2.tripod.com/abdoon.htm>. Erişim tarihi: 12.08.2003.
2. **Ayoub MA, Hunter AG (1993).** *Parthenogenetic activation of in vitro matured bovine oocytes.* J. Dairy Sci. 76: 421-429.
3. **Birler S, Pabuççuoğlu S, Alkan S, Evecen M İleri İK (1998).** *In vitro fertilize edilen siğir oositlerindeki pronükleer gelişim üzerine olgunlaştırma ve fertilizasyon sürelerinin etkisi.* Tr. J. Vet. Anim. Sci. 22: 1-15.
4. **Brackett BG, Seidel GE, Seidel SM (1981).** *Application of In vitro Fertilization.* Academic pres Inc. New York, USA.
5. **Brackett BG, Zuelke KA (1993).** *Analysis of factor involved in the in vitro production of bovine embryos.* Theriogenology, 39: 43-64
6. **Brewis IA, Wong CH (1999).** *Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida.* J. Reprod. Fert. 4: 135-142.
7. **Chen HH, Suarez SS (2001).** *Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation.* J. Reproduction, 122: 519-526.
8. **Chian RC, Okuda K, Niwa K (1995).** *Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation.* Anim Reprod. Sci. 38: 37-48.
9. **Fukui Y, Sonoyama T, Mochizuki H, Ono H (1990).** *Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro.* Theriogenology, 34 (3): 579-591. **Galli C, Lazzari G (1996).** *Practical aspects of IVM/IVF in cattle.* Anim. Reprod. Sci. 42: 371-379.
10. **Glied DW, Rosenkrans CF, Rorie RW, Rakes JM (1996).** *Effects of oocyte maturation land, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development.* J. Dairy Sci. 79: 532-535.
11. **Gordon I (1994).** *Laboratory Production of Cattle Embryos.* Cab international Co., Wallingford UK.
12. **Goto K, Kajihara Y, Koba M, Kosaka S, Nakanishi Y, Ogawa K (1989).** *In vitro fertilization and development of in vitro matured bovine follicular oocytes.* J. Anim. Sci. 67: 2181-2185.
13. **Hafez ESE (1993).** *Reproduction in Farm Animals.* Ed.:Hafez E.S.E., sixth edition. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
14. **Hunter RHF (1996).** *Ovarium control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilization to avoid polyspermy.* Molecular Reprod. Develop. 44: 417-422.
15. **Iritani A, Niwa K (1977).** *Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture.* J. Reprod. Fert. 50:119-121.
16. **Iqbal N, Hunter AG (1995).** *Comparison of bovine sperm capacitation systems for ağabeylity of sperm to penetrates zona-free hamster oocytes and bovine oocytes matured in vitro.* J. Dairy Sci. 78: 77-83.
17. **Kato H, Iritani A (1993).** *In vitro fertilization in cattle.* Molecular Reprod. Develop. 36: 229-231.
18. **King GJ (1993).** *Fertilization, Pregnancy and Parturition* in: Bovine Artificial Insemination Technical Manual. Ed.: Penner P. Second edition. CAAB, Ontario, Canada.
19. **Leibfried-Rutledge ML (1999).** *Factors determining competence of in vitro produced cattle.* Theriogenology, 51: 473-485.
20. **Mc Donald LE (1989).** *Veterinary Endocrinology and Reproduction.* Ed.: Mc Donald L.E., fourth edition. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
21. **Moore HDM, Akhondi MA (1996).** *In vitro maturation of mammalian spermatozoa.* J. Reprod. Fert. 1: 54-60.
22. **Mori J (1999).** *Textbook of Hormones of reproduction in farm animals –Basic and practical advances-* National Livestock Breeding Center pres, Shirakawa, Japan.
23. **Muyan M (1984).** *Memelilerde fertilizasyon.* Doğa Bilim Dergisi. 8 (2): 191-208.
24. **Nagai T (2001).** *The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes.* Theriogenology, 55: 1291-1301.
25. **Parrish JJ, Susko JLP, Leibfried MLR, Crister ES, Eyestone WH, First NL (1986).** *Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen.* Theriogenology, 25 (4): 591-600.
26. **Schneider CS, Ellington JE, Wright Jr RW (1999).** *Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture.* Theriogenology, 51: 1085-1098.
27. **Shioya Y (1993).** *Calf production by in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro.* JARQ 26 (4): 287-293.
28. **Shioya Y (1999).** *In vitro fertilization in cattle.* National Livestock Breeding Centre pres, Shrakawa, Japan.
29. **Sungur H, Yurdaydın N (1991).** *Çiftlik hayvanlarında oosit maturasyonu ve in vitro fertilizasyon.* Lalahan Hay. Arş. Ens. Derg. 31 (3-4): 67-77.
30. **Swenson MJ (1984).** *Duke's Physiology of Domestic Animals.* Ed.: Swenson M.J. Tenth edition. Cornell University press, London, England.
31. **Takahashi Y, Hishinuma M, Matsui M, Tanaka H, Kanagawa H (1996).** *Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere.* J. Vet. Med. Sci. 58 (9): 897-902.

32. **Tekin N, Daşkın A, Akçay E (2001).** *Boğa spermatozoonlarının in vitro kapasitasyonu ve fertilizasyonu.* Turk J. Vet. Anim. Sci. 25: 349-358.
33. **Thibodeaux JK, Menezo Y, Roussel JD, Hansel W, Goodeaux LL, Thompson DL, Godke RA (1992).** *Coculture of in vitro fertilized bovine embryos with oviductal epithelial cells originating from different stages of the estrous cycle.* J. Dairy. Sci. 75: 1448-1455.
34. **Toyoda Y (2000).** *Mause sperm capacitation and fertilization in a defined medium.* Symposium on Embryo Development and Livestock Breeding, March 2000. MAFF, Livestock Breeding Research Inst. Tsukuba, Japan.
35. **Truelson SL, Graham JK, Mortimer RG, Field TG (1996).** *In vitro penetration into bovine oocytes and zona- free hamster oocytes by bull spermatozoa treated with liposomes.* J. Dairy Sci. 79: 991-999.
36. **Van Soom A, Kruif A (1998).** *Bovine embryonic development after in vivo and in vitro fertilization.* Reprod. Dom. Anim. 33:261-265.
37. **Yang X, Jiang S, Foote RH (1993).** *Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures.* Molecular Reprod. Develop. 34: 94-100.
38. **Yang X, Jiang S, Foote RH (1993).** *Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures.* Molecular Reprod. Develop. 34: 94-100.