

DEĞİŞİK KÜLTÜR SİSTEMLERİ, VASATLARI VE GRANULOZA HÜCRELERİ İLE KOKÜLTÜRÜN MEMELİ OOSİTLERİNİN İN VİTRO MATURASYONUNA ETKİSİYLE İLGİLİ DENEYSEL ARAŞTIRMALAR

Ali Eroğlu¹

Exmeniteller Untersuchungen über die Einflüsse der verschiedenen Kultivierungssysteme, Medien und der Kokultivierung mit den Granulosazellen auf extrakorporale Reifung der Säugetiereizellen

Zusammenfassung: In der vorliegenden Arbeit wurden Einflüsse der verschiedenen Kultivierungstechniken auf die in vitro-Reifung der Schweineeizelle untersucht. Die intakten Eizellen wurden durch die Verwendung des beweglichen oder unbeweglichen Kultivierungssystems in TC 199 oder Whitten's Medium und in Anwesenheit (Kokultivierung) oder Abwesenheit der Granulosazellen kultiviert.

In beiden Medien wiesen die Eizellen hohe Reifungsraten auf.

Im beweglichen Kultivierungssystem wurde signifikant höhere Reifungsrate in Anwesenheit der Granulosazellen im Vergleich zu deren Abwesenheit erzielt. Dagegen waren die Reifungsraten im unbeweglichen Kultivierungssystem in Abwesenheit der Granulosazellen hoch.

In der Kokultivierung mit Granulosazellen steigerte das bewegliche Kultivierungssystem im Vergleich zu dem unbeweglichen System die gute Kultivierungstechnik zu sein.

Berücksichtigt man den positiven Einfluss der Granulosazellen auf die Zytoplasmareifung der Eizelle, so scheint die Kokultivierung der Eizellen mit Granulosazellen im beweglichen System zur Erlangung der vollständigen Befruchtungs- und embryonalen Entwicklungskompetenz eine gute Kultivierungstechnik zu sein.

Özet: İn vitro kültür tekniklerinin geliştirilmesi sonucu memeli oositlerine, fizyolojik döllenme ve embriyonik gelişme yeteneğinin kazandırılmasıyla değerli dişi materyalden daha iyi yararlanma mümkün olacaktır. Bu çalışmada değişik kültür tekniklerinin, oositlerin in vitro olgunlaşmasına etkisi incelendi. İntakt oositler, TC 199 ve Whitten's Mediumu kullanılarak, hareketli ve hareketsiz sistemlerde, granuloza hücrelerinin varlığında (kokültür) veya yokluğunda kültüre edildiler.

1: Öğr. Gör. Dr., Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE

Her iki vasatta da yüksek olgunlaşma oranları elde edildi.

Hareketli sistemde, granuloza hücrelerinin varlığı olgunlaşma oranını istatistiki olarak da belirgin şekilde artırdı. Buna karşın hareketsiz sistemde, intakt oositlerin, granuloza hücreli költüre edildiklerinde daha yüksek oranda olgunlaştıkları görüldü.

Oositlerin granuloza hücreleri ile költüründe, hareketli sistem, hareketsiz sisteme göre olgunlaşma oranlarını belirgin şekilde yükseltir.

Granuloza hücrelerinin sitoplasmik olgunlaşmaya olumlu etkisi de dikkate alındığında, döllenme ve gelişme yeteneğinde olgun oositler elde etmek için hareketli sistemde granuloza hücreleriyle költürün, iyi bir model olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Giriş

Memeli oositlerinde mayotik bölünme, fetal yaşamın erken dönemlerinde başlar ve doğumdan hemen önce ya da kısa bir süre sonra profaz I'in diploten safhasında durur. Cinsel olgunluğa kadar olan zaman sürecinde oositlerde sentez olayları devam eder, follikül ile birlikte oositler de (41). zona pellucida da bu sırada sentezlenir.

Mayozun tekrar başlamasına kadar olan süreçte oositler çok büyük germinal vezikül içerdiğinden mayozun bu dönemi, veziküller safha olarak da adlandırılır(2).

Cinsel olgunluktan sonra, her östrüs siklusunda ovulasyon öncesi gonadotropin piki, türe göre değişen sayıdaki oositte mayozu tekrar başlatır. Germinal vezikülün çözülmesini (Germinal Vesicle Breakdown, *GVBD*) metafaz I, anafaz I, telofaz I safhaları izler ve 1. mayotik bölünme tamamlanarak mayoz, metafaz II safhasında tekrar durur. Memelilerin çoğunda ovulasyon bu safhada şekillenirken, 2. mayotik bölünmenin tekrar başlayıp tamamlanması spermatozoonun ovuma girmesi ile mümkün olur (41).

Germinal vezikülün çözülmesinden metafaz II safhasına kadar süren dönemde hem kromozomal hem de sitoplasmik düzeyde yapısal ve biyokimyasal değişimler yer alır. Bu değişimler sonucu kromozom sayısı yarıya düşerek (haploid) oositler, sekonder oosit haline geçer, döllenme ve embriyonik gelişme yeteneği kazanırlar. Bu nedenle veziküller safha ile metafaz arasındaki olaylar, olgunlaşma (maturation) ya da mayotik olgunlaşma (meiotic maturation) şeklinde tanımlanmaktadır. Dolayısıyla veziküller safhadaki oosit, olgunlaşmamış (immature), metafaz II safhasındaki ise olgun (mature) oosit olarak nitelendirilmektedir (24,45,47).

Maturasyonun hem çekirdeksel (nuclear maturation) hem de sitoplasmik (cytoplasmic maturation) olarak şekillendiği varsayılmaktadır (41,48). Veziküller safha ile metafaz II safhası arasındaki kromozomal değişiklikler, çekirdeksel olgunlaşma ile anlatılırken, yine aynı dönemde sitoplazmada meydana gelen ve

oosite hatasız dölleme, embriyonik gelişme yeteneği kazandıran olaylar stoplazmik olgunlaşma ile açıklanmıştır.

Ovulasyon öncesi *in vivo* şekillenen mayotik olgunlaşmanın *in vitro* da gerçekleşebileceğini ilk kez Pincus ve Enzmann (31) göstermişlerdir. Bu araştırmacılar, tavşan oositlerinin follikülden dışarıya alınıp uygun bir vasatta kültüre edilmesi halinde, bir bölüminün veziküler safhadan metafaz II safhasına kadar ilerlediğini saptamışlardır. Herhangi bir hormon katkısı olmadan, spontan olarak gerçekleşen bu şekildeki *in vitro* olgunlaşma, daha sonra diğer memeli oositlerde de gözlenmiştir (5). Ancak *in vitro* olgunlaşan oositlerde çeşitli dölleme bozuklukları gözlenmiş veya bunlar embriyonik gelişme gösterememişlerdir. Bu durum, *in vitro* kültür sırasında sitoplasmik olgunlaşmanın yetersiz şekillenmesine bağlanmıştır (20,40). Biyoteknolojinin diğer alanlarına paralel olarak, son yıllarda bu alanda da önemli aşamalar kaydedilmiş, başarı oranı düşük de olsa *in vitro* olgunlaşmış ve döllenen oositlerin taşıyıcılara transferinden sonra canlı yavruların doğduğu bildirilmiştir (10,12,15,30).

Oosit maturasyondaki moleküler olayların açıklığa kavuşturulması ve *in vitro* kültür tekniklerinin optimal hale getirilerek oositlere hatasız dölleme ve embriyonik gelişme yeteneğinin kazandırılmasıyla dışı materyaldeki binlerce yumurta hücresinden yararlanma olanağı doğacaktır. Bunun hayvan yetiştiriliciliğindeki sonucu ise yüksek verimli dişilerden maksimum düzeyde döl verimi almak olacaktır. Ovaryumlar dışındaki çeşitli genital hastalıklar sonucu ortaya çıkan infertilite, yüksek verimli, değerli dışı hayvanlardan çok sayıda yavru almada engel teşkil etmeyecektir.

Bu çalışmada, *in vitro* maturasyonla ilgili kültür tekniklerinin geliştirilmesi üzerinde durulmuştur.

Materyal ve Metot

Oositlerin Toplanması

Çok sayıda oosit, diğer çiftlik hayvanlarına göre domuzlardan daha kolay elde edilebildiğinden bu çalışmada domuz oositleri kullanıldı. Prepubertal dönemdeki domuzların mezbahada kesilip karın boşluğunun açılmasından hemen sonra ovaryumlar alınarak bir termos içinde bulunan vücut ısısındaki %0.9'luk NaCl çözeltisine konuldu. Yeteri kadar toplandıktan sonra, ovaryumlar laboratuvara nakledildi. Laboratuvarda, ovaryumlar üzerindeki 3-5 mm çapındaki tersiyer folliküller enzisyon ile açıldı ve oositler, vücut ısısındaki steril %0.9'luk NaCl çözeltisi ile folliküllerden yıkanarak petri kutularına alındı. Daha sonra oositler, 1g/l bovine serum albumine (BSA, Pure, Serva, FRG) eklenmiş Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, Serva FRG) vasatına aktarıldı ve stereo mikroskopla 63-100X büyütmede morfolojik değerlendirmeleri yapıldı. Bozulmamış (intakt) kumulus ooforusa sahip ve sitoplazmik dejenerasyon göstermeyen oositler kültür için seçildi. Seçilen intakt oositler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra kültür kaplarına dağıtıldı. Bunların gerçekten veziküler safhada

olup olmadığını kontrol etmek için, bir bölüm kültüre edilmeden doğrudan tespit edildi, boyanarak mayotik safhası incelenmişti. Hepsinin veziküler safhada olduğu görüldü. Ovaryumların toplanıp nakledilmesi ve kültürün başlamasına kadar laboratuvarında yapılan işlemlerin süresi oosit sayısına göre 2-4 saat arasında değişti.

Granuloza Hücrelerinin Kazanılması, Ölü-Canlı Hücre Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Granuloza hücreleri, mezbahadan toplanan ovaryumlar üzerindeki 5-8 mm. çapındaki tersiyer folliküllerden kazanıldı. Bu folliküller, ovaryum dokusundan dikkatlice ayrıldı, içinde steril PBS bulunan bir petri kutusuna konuldu. Daha sonra folliküller kesilerek açıldı, çok ince çelik telden yapılmış bir öze ve pens yardımıyla granuloza hücreleri, stereo mikroskop altında folikül duvarından PBS içine kazındı. İçinde milyonlarca granuloza hücresi bulunan PBS, tüpe aktarılarak 1500 devir/dakikada, 5 dakika süreyle santrifüje edildi. Bundan sonra PBS, pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve hücreler yeni eklenen PBS içinde süspansiyon haline getirildiler. Bu süspansiyondan birkaç damla alınıp trypan mavisi (% 0.06) ile boyandı, hemositometre yardımıyla sayım yapılarak süspansiyondaki ölü-canlı hücre konsantrasyonu belirlendi. Ölü-canlı ayrımı, hücrelerin boya maddesini sitoplazmalarına alıp almamasına göre yapıldı. Bu şekilde kazanılan granuloza hücrelerinin % 60-70 oranında canlı olduğu görüldü.

Araştırma Grupları ve Oositlerin Kültürü

Oositler, komponentleri itibariyle kompleks (TC 199 whit Earle's salts, Serva, FRG) ve daha basit yarı tanımlanmış (Whitten's medium (17)) iki farklı vasatta, hareketli ve hareketsiz kültür sisteminde, granuloza hücrelerinin varlığında veya yokluğunda olmak üzere toplam 8 ayrı araştırma grubunda kültüre edildiler ve olgunlaşmaları incelendi. Şekil 1, bu araştırma guruplarını şematize etmektedir.

Kültür vasatları, on günde bir taze olarak hazırlanıp membran filtreler (1.2µm, 0.2µm, Millipore) yardımıyla sterilize edildi, kullanıma kadar 4°C de saklandı. Her iki vasata da 1g/l BSA (Pure, Serva, FRG), Gentamycin (Serva, FRG), 2mg/l Amphotericin B (Serva, FRG), 5 IE/ml PMSG (Intergonan, Vemie, FRG), 5 IE/ ml hCG (Ekluton, Vemie, FRG) katıldı.

Kültür için seçilen intakt oositler, araştırma gruplarına rastgele dağıtıldıktan sonra nemli ortamda, 39° C de ve %5 CO₂ %5 O₂ %90 N₂ ' dan oluşan gaz karışımı altında 44-48 saat kültüre edildiler. Kültür için steril petri kutuları (tissue culture petri dishes, Flow laboratory, UK) kullanıldı. 2ml vasat içeren her bir petri kutusuna 20 kadar oosit ve kokültür halinde 1.000.000 / ml konsantrasyonda canlı

granuloza hücresi konuldu. Hareketli kültür, vasatların bir motor yardımıyla hafifçe çalkalanması sağlanarak yapıldı.

Olgunlaşmanın İncelenmesi

Kültür süresi sonunda oosit çevresindeki hücreler, mekanik olarak uzaklaştırıldı ve oositler alkol asetik asit (3:1) karışımı içinde yaklaşık 24 saat süreyle tespit edildiler. Bundan sonra %1 lik aceto- kontrast mikroskop altında 400-600x büyütmede mayotik safhalarına göre sınıflandırıldılar. Sınıflandırılma HUNTER ve POLGE (18)'un kriterine göre yapıldı. Kültür sonunda çapı (ø) 100 µm'den küçük ya da dejenere gözüken oositler olgunlaşma yönünden değerlendirilmeyip sayıları kaydedildi.

Bulguların Değerlendirilmesi

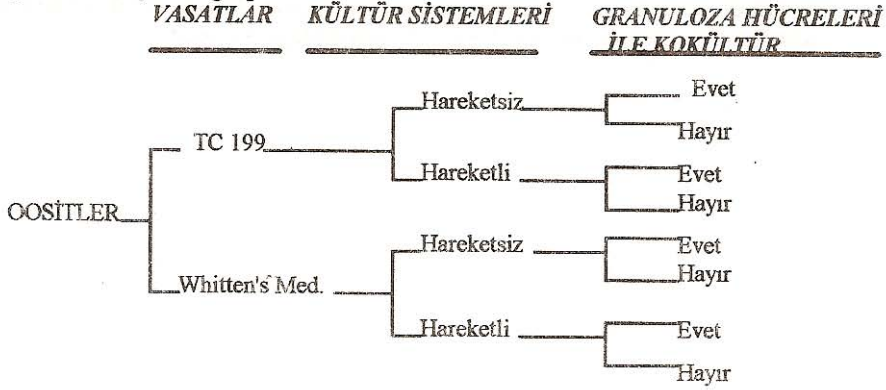
Bulguların istatistiki değerlendirilmesi, "Microstat" (Ecosoft, 1984) adlı bilgisayar programı kullanılarak X^2 -testi ile yapıldı. İstatistiki değerlendirmede olgunlaşma safaları;

- 1- Veziküler safha (olgunlaşmamış oositler)
- 2- Prometafaz I - Telo faz I (olgunlaşan oositler)
- 3- Metafaz II (olgun oositler)

ya da

- 1- Veziküler safha (olgunlaşmamış oositler)
- 2- Prometafaz I- Metafaz II (olgunlaşan ve olgun oositler) şeklinde gruplandırılarak araştırma birbirleriyle karşılaştırıldı (Tablo 3 ve 4). 0.05 istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

Şekil 1: Araştırma grupları



Bulgular

Oositlerin TC 199 ve Whitten's Medium'unda değişik şekillerde kültüre edilmesi sonucu elde edilen olgunlaşma ile ilgili bulgular tablo 1 ve 2'de özet olarak verilmiştir. Araştırma gurupları arasındaki olgunlaşma farklarının istatistiki değerlendirme sonuçları tablo 3 ve 4'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Oositlerin TC 199 vasatında, hareketsiz ve hareketli kültür sisteminde, granuloza hücrelerinin varlığında veya yokluğunda olgunlaşma oranları*

	<i>HAREKETSİZ</i>		<i>HAREKETLİ</i>	
	<i>O + G</i>	<i>O - G</i>	<i>O + G</i>	<i>O - G</i>
V	15 (%15.2)	2 (% 2.6)	3 (% 4.1)	12 (% 14.1)
PM1	-	3 (% 4.0)	1 (% 1.4)	-
M1	23 (%23.2)	13 (%17.1)	16 (%21.9)	21 (%24.7)
A1	1 (% 1.0)	1 (% 1.3)	-	-
T1	-	-	-	-
M2	60 (%60.6)			52 (% 61.2)
TOPLAM	99	76	73	85
Dej. veya < 100	2 / 101 (% 2.0)	2 / 78 (% 2.6)	4 / 77 (% 5.2)	6 / 91 (% 6.6)

VS: Veziküler safha PM1 : Prometafaz I M1: Metafaz I

A1: Anafaz I T1: Telofaz I M2 : Metafaz II

* Kültür sonunda dejenere veya çapları 100 µm'den küçük olarak gözlenen oositler , olgunlaşma oranları hesaplanırken dikkate alınmadı

Tablo 2: Oositlerin Whitten's medium'unda, hareketsiz ve hareketli kültür sisteminde, granuloza hücrelerinin varlığında veya yokluğunda olgunlaşma oranları*

	<i>HAREKETSİZ</i>		<i>HAREKETLİ</i>	
	<i>O + G</i>	<i>O - G</i>	<i>O + G</i>	<i>O - G</i>
V	17 (% 19.8)	5 (% 14.7)	1 (% 1.7))	10 (% 20.0)
PMI	6 (% 6.9)	2 (%5.9)	-	-
M1	10 (% 11.6)	1 (% 2.9)	5 (% 8.6)	12 (% 24.0)
A1	1 (% 1.2)	-	-	1 (% 2.0)
T1	-	-	-	-
M2	52 (% 60.5)	26 (%76.5)	52(%89.7)	27 (% 54.0)
TOPLAM	86	34	58	50
Dej. veya < 100	2 / 101 (% 2.0)	2 / 78 (% 2.6)	4 / 77 (% 5.2)	6 / 91 (% 6.6)

VS: Veziküler safha

Pm1 : Prometafaz I

M1 : Metafaz I

A1: Anafaz I

T1: Telofaz I

M2 : Metafaz II

* Kültür sonunda dejenere veya çapları 100 µm'den küçük olarak gözlenen oositler, olgunlaşma oranları hesaplanırken dikkate alınmadı.

Tablo 3: Araştırma grupları arasındaki olgunlaşma farklarının istatistiki değerlendirme sonuçları [Olgunlaşmış (VS), Olgunlaşan (PM - T) ve olgun (M) oositler şeklinde gruplandırma yapılarak değerlendirildi]

ARAŞTIRMA GRUPLARI			TC - 199				WHITTEN'S MEDIUM			
			H.siz		H.li		H.SİZ		H.li	
			O+G	O-G	O+G	O-G	O+G	O-G	O+G	O-G
TC 199	H. siz	O+G								
		O-G	A							
	H. li	O+G	A							
		O-G		A						
WHITTEN'S	H. siz	O+G		A	A					
		O-G		A	A					
	H. li	O+G	A		A	A	A	A		
		O-G		A	A				A	

H. siz: Hareketsiz kültür H .li: Hareketli kültür
O+G: Oosit + Granuloza hücre kültürü (Kokültür)
O-G: Granuloza hücre kültürü (kokültür)
A: Farklar istatistiki olarak anlamlı

Tablo 4: Araştırma grupları arasındaki olgunlaşma farklarının istatistiki değerlendirme sonuçları
[Olgunlaşmış (VS) ve olgunlaşan ile olgun (PM -M) oositler şeklinde gruplandırma yapılarak değerlendirildi]

ARAŞTIRMA GRUPLARI			TC - 199				WHITTEN'S MEDIUM			
			H.siz		H.li		H.SİZ		H.li	
			O+G	O-G	O+G	O-G	O+G	O-G	O+G	O-G
TC 199	H. siz	O+G								
		O-G	A							
TC 199	H. li	O+G	A							
		O-G		A	A					
WHITTEN'S	H. siz	O+G		A	A					
		O-G		A	A					
	H. li	O+G	A			A	A			
		O-G		A	A				A	

H.siz: Hareketsiz kültür H.li : Hareketli kültür
O+G : Oosit + Granuloza hücre kültürü (Kokültür)
O-G : Granuloza hücreleri olmadan intakt oosit kültürü
A: Farklar istatistiki olarak anlamlı

Tartışma ve Sonuç

Araştırma bulguları incelendiğinde, her iki vasatta da oositlerin yüksek oranda olgunlaştıkları görülmektedir. Genel olarak domuz oositlerinin kültüründe TC 199 gibi kompleks vasatlar kullanılmıştır (9,28,36,42,43). TSAFRIRI ve CHANNING (42,43) piruvat, laktat, insülin ekledikleri TC 199 vasatında % 50-62 arasında olgunlaşma (Metefaz II) elde etmişler ve bu vasatın domuz oositlerinin in vitro maturasyonu için çok uygun olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonraki araştırmalarda, TC 199 vasatında kültüre edilen domuz oositlerinin % 34-76 oranları arasında olgunlaştıkları saptanmıştır (9,28). Bu çalışmadaki araştırma gruplarında, materyal ve metotta söz edilen koşullar altında TC 199 vasatında oositlerin kültüre edilmesiyle %60 ile 75 arasında olgunlaşma oranı gözlenmiştir. Bu olgunlaşma oranları, literatürde bildirilen oranların üst sınırı düzeyindedir.

Değişik serumlar katılmış kompleks yapılı vasatlar, çok sayıda tanımlanmamış faktörler içerdiğinde bunların gerek hücreler üzerine etkisi, gerekse kültüre eklenen çeşitli maddelerle (örneğin hormonlar) karşılıklı etkileşimleri tam olarak bilinmemektedir. Bu da araştırma sonuçlarının tekrarlanabilirliğini ortadan kaldırma sakıncasını doğurmaktadır. Bu nedenle oositlerin in vitro kültürü ile ilgili koşulların araştırılması ya da çeşitli maddelerin oositlerin in vitro maturasyonuna etkisinin incelenmesi gibi çalışmalarda komponentleri kimyasal olarak tanımlanmış basit yapılı vasatlar kullanmak daha uygundur. Ancak bu tür vasatlarla oositin in vitro maturasyonunda olumlu sonuçlar alınmamıştır (22,38).

Değişik serumlara göre BSA kimyasal olarak daha iyi karakterize edildiğinden ve bilinmeyen çeşitli faktörlerle kontaminasyon olasılığı daha az olduğundan *BAVISTER* (3) makromolekül olarak *BSA* katılmış vasatları yarı tanımlanmış (semi defined)olarak nitelemiştir. Domuz oositleri basit yapılı, yarı tanımlanmış *BMOC-3* (22) ve *KRB* (9) gibi vasatlarda kültüre edilmiş, %13 ve %26 oranında olgunlaşma gözlenmiştir. Bu çalışmada, yarı tanımlanmış Whitten'in vasatı kullanılarak çeşitli araştırma gruplarında % 54'den % 89.7'ye kadar olgunlaşma oranları elde edilmiştir. Literatürde bildirilen oranlara göre bu çalışmada elde edilen oldukça yüksek olgunlaşma oranları, kültür için daha kaliteli oositlerin seçilmesi ile ve Whitten's Medium'u ile bu çalışmadaki kültür koşullarının, oositlerin in vitro maturasyonuna uygun olmasıyla açıklanabilir. Gerçekten de daha önceki çalışmalarda inkübasyon ısısı, gaz karışımı gibi kültür koşullarının ve mediumların bileşiminin olgunlaşma oranını etkilediği bildirilmiştir (9,11,16).

Whitten'in vasatında en yüksek olgunlaşma oranı, granuloza hücreleri ile hareketli kokültür sonucunda (%89.7), *TC 199*'da ise intakt oositlerin granuloza hücreleri olmadan hareketsiz kültüründe (%75,0) gözlenmiştir. Her iki vasattaki olgunlaşma oranları karşılaştırıldığında, basit yapılı, yarı tanımlanmış Whitten's Medium'un oositin in vitro maturasyonuna en az kompleks yapılı *TC 199* kadar uygun olduğu görülmektedir.

Genel olarak araştırma gruplarındaki olgunlaşma oranlarına bakıldığında; granuloza hücreleri ile kokültürün hareketli kültür sisteminde daha iyi sonuç verdiği, buna karşılık oositlerin granuloza hücreleri olmaksızın yalnız kültüründe hareketsiz kültür sisteminin daha iyi olduğu görülmektedir. Hareketli kültür sisteminde granuloza hücreleri ile oositler, vasatın yavaş şekilde hareket etmesiyle biraraya gelip birbirine yapışmakta ve bir yumak oluşturmaktadırlar. Dolayısıyla granuloza hücrelerinin, oositleri en azından mekanik olarak koruduğu düşünülebilir. Ancak oositlerin hareketsiz sistemde granuloza hücrelerinin varlığında elde edilen olgunlaşma oranlarının, hareketli sistem kokültürü olgunlaşma oranlarına göre ve yine granuloza hücreleri olmaksızın hareketsiz sistemde gözlenen olgunlaşma oranlarına göre daha düşük olması ve bunların istatistik olarak da anlamlı olması dikkate alındığında, granuloza hücrelerinin hareketli ve hareketsiz sistemde oosit maturasyonunu farklı şekilde etkilediği akla gelmektedir. Literatürdeki veriler de bu fikri desteklemektedir. Bilindiği gibi hareketsiz sistemde kültüre edilen hücreler, buldukları kabın tabanına yapışarak

bir tabaka oluşturan şekilde gelişmektedirler (monolayer culture). Bu şekilde gelişen granuloza hücrelerinin fazla miktarda progesteron salgıladığı gözlenmiştir (25). İn vivo maturasyon sırasında follikül sıvısındaki steroid hormon profilleri değişiklik göstermektedir. Olgunlaşmanın ilk yarısında östrojen konsantrasyonunun, ikinci yarısında ise progesteron konsantrasyonunun yüksek olduğu bulunmuştur (1,6,8). Halbuki hareketsiz sistemde granuloza hücreleri ile kültüre edilen oositler, olgunlaşmanın başlangıcından itibaren progesteron konsantrasyonunun yüksek olduğu bir ortamda tutulmuş olurlar. Böyle bir durumun maturasyon üzerine etkisi, enzim inhibitörleri kullanılarak foliküller steroid konsantrasyonunun değiştirilmesi ile incelenmiş ve çeşitli anormallikler saptanmıştır (26). LUTTERBACH ve arkadaşları da (21) hareketsiz kültürde luteinizasyonun daha fazla olduğunu ve bunun da oosit maturasyonunu negatif etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Bunlara karşılık hareketli sistemde granuloza hücrelerinin steroid hormon profilleri, in vivo maturasyon sırasındaki steroid hormon profillerine benzemektedir (39).

Granuloza hücreleri ile kokültürün, oositlerin stoplazmik olgunlaşmasını olumlu şekilde etkilediği ve oositlerin hatasız döllenme ile embriyonik gelişmesinde önemli rol oynadığı çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (4,13,14,21,27,39,46).

Bu çalışmada, granuloza hücreleriyle kokültürü sonunda daha az sayıda dejenere ya da çapı 100µm'den küçük oosit gözlenmiştir. Ancak bu tür oositlerin sayıca az olması, istatistiki yönden kesin bir ifade kullanmaya olanak vermemektedir.

Granuloza hücrelerinin stoplazmik olgunlaşma üzerine olumlu etkisi genel bir kabul görünürken, çekirdeksel olgunlaşmaya olan etkisiyle ilgili araştırma sonuçları çelişkilidir. Bazı araştırmacılara göre granuloza hücreleri, oositlerle birlikte kokültürlerinde çekirdeksel olgunlaşmayı inhibe etmektedir (34,35,37,43). Ancak kültür ortamına LH da katıldığında bu inhibisyon görülmemekte ve I. mayotik bölünme tekrar başlayıp tamamlanmaktadır (44). Buna karşın başka bir grup araştırmacı, granuloza hücrelerinin oositlerle kokültürü sırasında çekirdeksel olgunlaşmanın engellendiğini saptayamamışlardır (7,19,29,32,33,49). Bu çalışmada, oositlerin PMGS ve hCG içeren TC-199 ve Whitten's Medium'unda, granuloza hücreleriyle kokültürleri sonucu yüksek olgunlaşma oranları elde edilmiştir.

Araştırma bulguları değerlendirildiğinde, genel olarak şu sonuçlar çıkarılabilir:

-Bu çalışmada kullanılan teknikte, %60-70 oranında canlı, çok sayıda granuloza hücresi kazanılabilmektedir.

-Basit yapılı, yarı tanımlanmış Whitten'in vasatı, en az kompleks yapılı TC 199 kadar oosit maturasyonuna uygundur.

-Hareketli sistemde, granuloza hücrelerinin varlığı, oositlerin olgunlaşmasını olumlu şekilde etkilemektedir.

-Buna karşın hareketsiz sistemde, granuloza hücreleri olmadığında daha yüksek olgunlaşma oranları elde edilebilmektedir.

-Oositlerin granuloza hücreleri ile kokültüründe, hareketli sistem, hareketsiz sisteme göre daha iyi sonuç vermektedir.

-Daha önceki araştırma bulguları da dikkate alındığında, özellikle granuloza hücreleriyle kokültür sisteminin, gerek stoplazmik gerek çekirdeksel olgunlaşma için daha uygun olduğu görülmektedir.

Kaynaklar

1. Ainsworths, L., Tsang, B.K., Downey, B.R., Marcus, G.J. and Armstrong, D.T.(1980): *Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during pr.ovulatory development of porcine follicles.* Biol.Reprod. 23,621-627
2. Baker, T.G.(1976): *Oogenese und Ovulation.* In: *Fortflanzungsbiologie der Säugetiere*, Band 1,pp.19-40 Verlag Paul Parey Berlin-Hamburg
3. Bavister, B.D.(1986): *Animal in vitro fertilization and embryo development.* In: *Developmental Biology*, Ed. R.B.L.Gwatkin, Vol.4, pp.81-148.Plenum Publ.Corp., New York
4. Berg, U., Brem, G.(1989): *In vitro production of bovine blastocysts by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture.* Zuchthyg., 24, 134-139
5. Biggers, J.D.(1973): *Oogenesis and ovum maturation.* In: *The regulation of mammalian reproduction*, Eds. S.J.Segel,R. Crozier, P.A. Corfinan, and P.G.Condliffje, pp.273-283. Thomas, Springfield, Illinois
6. Callesen, H., Greve, T.and Hyttel, P.(1986): *Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle.* Theriogenology. 25, 71-86
7. Critser, E.S., Leibfried-Rutledge, M.L., Eyestone, W.H., Northey, D.L. and First, n.l.(1986): *Acquisition of developmental competence during maturation in vitro.* Theriogenology 25,150 (Abstr.)
8. Dieleman, S.J., Kruip, T.A., Fontijne, P., De Jong, W.H., Van der Weyden, G.C.(1983): *Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone.* J. Endocrinol. 97,31-42
9. Eng, L.A., Kornegay, E.T.,Huntington, J., Wellman, T.(1986): *Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro.* J.Reprod. Fert. 76,657-662
10. Eppig, J.J., Schroeder, A.C. (1989): *Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro.* Biol.Reprod. 41,268-276
11. Eroğlu, A. (1993): *Experimental studies on in vitro maturation of porcine oocytes. I. Effects of medium, energy source and protein source on in vitro maturation rate.* Berl. Münch.Tierarztl.Wschr. (Baskıda)

12. Fukada, Y., Ichikawa, M., Naito, K., Toyoda, Y. (1990): *Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured With cumulus cells in vitro up to blastocyst stage.* Biol. Reprod. 42, 114-119
13. Fukui, Y., 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
14. Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S. Koba, M., Nakanishi, Y., Ogawa, K. (1988): *Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes.* J. Reprod. Fert. 83,753-758
15. Greve, T., Xu K.P., Callesen, H., Hyttel, P.(1989): *Calves resulting from in vitro fertilization of oocytes.* Zuchthyg., 24,79-83
16. Gwatkin, R.B.L., Haidri, A.A. (1974): *Oxygen requirements for maturation of hamster oocytes.* J. Reprod. Fert. 37,127-129
17. Hoppe, P.C., Pitts, S. (1973): *Fertilization in vitro and development of mouse ova.* Biol. Reprod. 8, 420-426
18. Hunter, R.H.F., Polge, C.(1966): *IMaturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin.*Reprod. Fert. 12,525-531
19. Leibfried, L., First, N.L.(1980): *Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro.* Biol. Reprod. 23,699-704
20. Leibfried, M.L., Bovister, B.D. (1983): *Fertilizability of in vitro matured oocytes from golden hamsters.* J.Exp. Zool. 226,481-485
21. Lutterbach,A., Koll, R.A. und Brem, G.(1987): *In vitro maturation of bovine oocytes in coculture with granulosa cells and their subsequent fertilization and development.* Zuchthyg. 22,145-150
22. McGaughey, R.W.(1977): *The maturation of porcine oocytes in minimal, defined culture media with varied macromolecular supplements and varied osmolarity.* Exp. Cell Res. 109,25-30
23. McGaughey, R.W.(1977): *The culture of pig oocytes in minimal medium, and the influence of progesterone and estradiol-17 β on meiotic maturation.*Endocrinology 100,39-45
24. McGaughey, R.W. (1978): *In vitro oocyte maturation.* In: "Methods in mammalian reproduction", Ed.:J.C.Daniel, pp.1-20, Academic Press, London.
25. Moor, R.M. (1977): *Sites of steroid production in ovine graafian follicles in culture.* J. Endocr.73,143-150
26. Moor, R.M.,Polge, C., Willadsen, S.M. (1980): *Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mamalian oocytes.* J. Embryol. exp. Morph. 56,319-335
27. Motlik, J. and Fulka, J.(1981): *Fertilization of rabbit oocytes cocultured with granulosa cells.* J.Reprod.Fert., 63,425-429
28. Motlik, J. Crozet, N., Fulka, J.(1984): *Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles.*J. Reprod. Fert. 72,323-328

29. Nekola, M.V., Smith, D.M. (1974): *Oocyte maturation and follicle cell viability in vitro*. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. Supp. 4,125-131
30. Pavlok, A., Motlik, J., Kanka, J.(1989): *In vitro techniques of bovine oocyte maturation, fertilization and embryo culture resulting in the birth of a calf*. Reprod. Nutr. Dev., 29,611-616
31. Pincus, G., Enzmann, E.V. (1935): *The comparative behavior of mammalian eggs in vivo und in vivo und in vitro: I. The activation of ovarien eggs*. J. Exp. Med. 62,665-675
32. Racowsky, C., McGaughey, R.W. (1982): *Further studies of the effects of follicular fluid and mambrana granulosa cells on the spontaneous maturation of pig oocytes*. J.Reprod. Fert. 66,505-512
33. Rice, C., McGaughey, R.W.(1980): *Interactions between the granulosa cell and the oocyte in vitro*. J. Anim. Sci. 51,Abstr.521
34. Sato, E., Ishibashi, T., Iritani, A. (1982): *Meiotic arresting substance separated from porcine ovarian granulosa cells and hypothetical arresting mechanism of meiosis*. In: *Intraovarian Control Mechanisms*, Eds. C.P.Channing & S.J.Segal, pp.161-173, Plenum, New York
35. Sato, E., Ueno, H., Koide, S.S. (1986): *Mouse oocyte maturation modulated by a granulosa cell factor and by heparin and heparin sulfate*. Gamete Res.13,115-124
36. Schaerf F.W., Anderson, L.D., Channing, C.P. (1982): *Steroidogenesis by isolated porcine oocyte-cumulus complexes: Lack of an inhibitory effect of low molecular weight fraction of porcine follicular fluid on conversion of androgen to estrogen*. Gamet Res. 5, 207-215
37. Sirard, M.A. and Bilodeau, S. (1990): *Effects of granulosa cell coculture on meiotic resumption of bovine oocytes*. J.Reprod. Fert. 89,459-465
38. Smith, D.M., Tyler, J.P.P., Erickson, G.F. (1987): *Effects of medium composition and progesterone on maturation in vitro of rabbit oocytes from Graafian follicles of different sizes*. J.Reprod.Fert. 54,393-400
39. Staigmiller, R.B., Moor, R.M. (1984): *Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle*. Gamete Res. 9, 221-229
40. Thibault, c. (1977): *Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes?* J. Reprod. Fert. 51 1-15
41. Tsafiriri, A. (1978): *Oocyte maturation in mammals*. In: *The Vertebrate Ovary*, Ed. R.E.Jones, pp.409-442, Plenum Press, New York-London
42. Tsafiriri, A., Channing, C.P. (1975): *Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro*. J. Reprod. Fert.43,149-152
43. Tsafiriri, A., Channing, C.P. (1975): *An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro*. Endocrinology 96,922-927

44. Tsafiriri, A., Channing, C.P., Pomerantz, S.H., Lindner, H.R. (1977): *Inhibition of maturation of isolated rat oocytes by porcine follicular fluid*. J. Endocrinol. 75,285-291
45. Tsafiriri, A., Dekel, N., Barami, S. (1982): *The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation*. J. Reprod. Fert. 64,541-551
46. Vanderhyden, B.C. and Armstrong, D.T. (1990): *Effects of gonadotropins and granulosa cell secretions on the maturation and fertilization of rat oocytes in vitro*. Molec. Reprod. Dev. 26, 337-346
47. Wassarman, P.M., Letourneau, G.E. (1976): *RNA synthesis in fully-grown mouse oocytes*. Nature 261,73-74
48. Wassarman, P.M., Schultz, R.M., Letourneau, G.E., LaMarca, M.J., Josefowicz W.J., Bleil, J.D. (1979): *Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro*. In: *Ovarian Follicular and Corpus Luteum Function*, Eds.C.P.Channing, J.Marsh, and W.A.Sadler, pp.251-268, Plenum Press, New York
49. Zeilmaker, G.H. (1978): *Observations on follicular lactate concentrations and the influence of granulosa cells on oocyte maturation in the rat*. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 18,529-533