

## KOYUN EMBRİYOLARININ İN VİTRO ÜRETİLMESİ ÜZERİNE OLGUNLAŞMA VE FERTİLİZASYON MEDYUMLARINA YAPILAN KATKILAR VE KOYUN OVIDUKT EPİTEL HÜCRELERİ İLE KO-KÜLTÜRÜN ETKİLERİ\*

Sema BİRLER\*\* Serhat PABUÇÇUOĞLU\*\* Serhat ALKAN\*\* Kemal AK\*\*  
Mithat EVECEN\*\* İ. Kamuran İLERİ\*\*

### Effects of supplements to maturation and fertilization media and co-culture with sheep oviductal epithelial cells on in vitro production of sheep embryos

**Summary:** In this study in which the effects of maturation and fertilization media supplements and co-culturing on in vitro production of sheep embryos were investigated, primary oocytes (n=454) collected from ovaries of slaughtered ewes were used. Oocytes divided randomly into 4 groups were matured for 26 h in TCM 199 medium with different supplements:

Group 1 (SH): TCM 199 medium supplemented by 20% sheep estrous serum, 10 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH and 1 µg/ml estradiol 17β,

Group 2 (S): TCM 199 medium supplemented by 20% sheep estrous serum,

Group 3 (H): TCM 199 medium supplemented by 10 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH and 1 µg/ml estradiol 17β, and

Group 4 (M): TCM 199 medium without serum and hormones.

After maturation, oocytes which were again divided into 3 subgroups were transferred in SOF medium supplemented by 2% (D), 5% (O) and 10% (Y) sheep estrous serum and fertilized in vitro for 18 h with fresh ram semen collected by electro-ejaculation and washed. After fertilization, oocytes were divided into 2 subgroups [Group 1 (KK): Co-culture with sheep oviductal epithelial cells; Group 2 (K): Culture without sheep oviductal epithelial cells] and cultured for 7 days. At the end of this period embryos were evaluated for their developments.

The highest cleavage and morula rates were obtained in SH+Y+KK group (62.5% and 43.8%, respectively) and the lowest rates (8.7% and 4.3%, respectively) in M+D+K group in this study.

According to the results, we concluded that supplementation of in vitro maturation media with 20% sheep estrous serum and hormones, in vitro fertilization media with 10% sheep estrous serum and co-culturing with sheep oviductal epithelial cells after fertilization could improve the cleavage and morula rates.

**Key words :** Sheep, in vitro production, media supplements, co-culture

\* Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No: 753/280795 ve B-160/080699

\*\* İ.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun 'i Tohumlama Anabilim Dalı, Avcılar/İstanbul

**Özet:** Koyun embriyolarının in vitro üretilmesi üzerine olgunlaşma ve fertilizasyon medyumlarına yapılan katkılar ve ko-kültürün etkilerinin incelendiği bu çalışmada mezbahada kesilen koyunların ovaryumlarından elde edilen primer oositler (n=454) kullanıldı. Oositler 4 gruba ayrılarak farklı katkıların bulunduğu TCM-199 medyumunda 26 saat olgunlaştırıldı:

Grup 1 (SH): %20 oranında koyun serumu, 10 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH ve 1 µg/ml estradiol 17β ilaveli TCM-199,

Grup 2 (S): %20 oranında koyun serumu ilaveli TCM-199,

Grup 3 (H): 10 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH ve 1 µg/ml estradiol 17β ilaveli TCM-199, ve

Grup 4 (M): hormon ve serum ilavesi olmayan TCM-199.

Olgunlaşmayı takiben oositler tekrar 3'er alt gruba ayrılarak %2 (D), %5 (O) ve %10 (Y) koyun östrus serumu ilaveli SOF medyumuna içerisine alındı ve üzerlerine elektro-ejakülatör yardımıyla alınmış ve yıkanmış taze koç sperması ilave edilerek 18 saat in vitro fertilize edildi. Fertilizasyonu takiben oositler kendi içlerinde tekrar 2'şer alt gruba [Grup 1 (KK): Koyun ovidukt epitel hücreleri ile ko-kültür; Grup 2 (K): Koyun ovidukt epitel hücreleri kullanılmayan kültür grubu] ayrıldı ve 7 gün kültüre edildi. Bu sürenin sonunda embriyoların gelişmeleri değerlendirildi.

Çalışmada en yüksek cleavage (yarıklanma) ve morula oranları SH+Y+KK grubunda (sırasıyla %62.5 ve %43.8), en düşük oranlar ise (sırasıyla %8.7 ve %4.3) M+D+K grubunda elde edildi. Bu sonuçlara göre, koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında %20 oranında koyun serumu ve hormonların, fertilizasyon medyumunda %10 oranında östrustaki koyun serumunun kullanılması ve fertilizasyon sonrası koyun ovidukt epitel hücreleri ile ko-kültür uygulanmasının yarıklanma ve morula oranlarını iyileştirdiği söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** Koyun, in vitro üretim, medyum katkıları, ko-kültür

## Giriş

Son yıllarda oldukça önem kazanan in vitro embriyo üretim çalışmaları, birçok araştırma için temel oluşturmaktadır. Memeli hayvan oositlerinin in vitro olgunlaştırılması, in vitro fertilizasyonu ve fertilizasyonu takiben elde edilen embriyoların in vitro kültürünü kapsayan bu çalışmalar ile, in vivo incelenmesi çok güç ve masraflı olan oosit ve erken dönem embriyoların gelişmeleri için gerekli olan şartlar ortaya konabilmektedir.

Koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılması için genellikle doku kültür medyumuna (TCM-199) (6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16), bu medyuma ilave olarak fetal buzağı serumu (FCS) (1, 8, 10, 11, 14) veya östrustaki hayvan serumu (3, 6, 8, 9, 12, 16) kullanılmaktadır. Mezbahada kesilen koyun ovaryumlarından elde edilen primer oositler olgunlaşma medyumuna içerisinde, %5 CO<sub>2</sub> ve %100'e yakın nemli ortamda, 38.5-39°C ısıda 22-26 saat bırakılmaktadır (1, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 16). Bu süre sonunda 1. polar cismini atan yani Metafaz II (M II) dönemine ulaşan oositler olgunlaşmış olarak kabul edilmektedir.

Koyun oositlerinin in vitro fertilizasyonu için çok farklı medyumlar kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok tercih edilen SOF (4, 10, 11, 14, 16) yanında, TL (1), DMH (2, 4, 13), BO (6) ve Talp (3) medyumları da kullanılmaktadır. Bu medyumlara değişik oranlarda östrustaki koyun serumu (SES) katılmakta [%2 (1, 10, 16), %10 (3, 11), %20 (2, 4, 5, 13, 14, 16)] ve oosit ve spermatozoonlar 18-20 saat bir arada bırakılmaktadır.

İn vitro fertilize edilen koyun oositlerinin in vitro kültürü amacıyla TCM-199 (6, 15), SOF (5, 10, 13, 15) veya MBMOC (1) medyumları kullanılmakta olup, bu medyumlara değişik oranlarda FCS (13, 15), SES (5, 6) katılmakta veya serum ilavesi yapılmamaktadır (1, 10). Ko-kültür amacıyla koyun ovidukt epitel hücreleri (5, 7, 15), inek ovidukt epitel

hücreleri (1), kumulus hücreleri monolayer'i (6) kullanılmaktadır. Koyun embriyoları genellikle 5-7 gün in vitro kültüre veya ko-kültüre edilmekte (1, 6, 10, 13) ve gelişmeleri değerlendirilmektedir.

O'Brien ve ark. (10), erişkin veya genç koyun ovaryumlarından elde edilen oositlerin in vitro fertilizasyonu sonucu kazanılan embriyoların çoğunlukla kültürdeki 6. gün blastosist dönemine eriştiğini, fakat erişkin koyunlardan in vitro fertilizasyonla elde edilen embriyoların daha erken (5. gün) blastosist dönemine ulaşabildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışma ile, koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılması, fertilizasyonu ve kültürü için gerekli olan serum, hormon ve ko-kültür ihtiyacının belirlenmesi, böylece mezbaha materyalinden çok sayıda embriyo elde edilerek, bu embriyoların transfer aşamalarına kadar geliştirilmesi amaçlandı.

### Materyal ve Metot

Çalışmanın materyalini İsmir mezbahasında (Tuzla-İstanbul) kesilen koyunların ovaryumları oluşturdu. Ovaryumlar, içerisinde 30-35°C ısıda serum fizyolojik (%0.9 NaCl) bulunan termos ile laboratuvara getirildi. İlk hayvanın kesiminden itibaren tüm oositlerin kazanılıp olgunlaşma medyumuna içerisinde inkübatöre konmasına kadar geçen sürenin 4-5 saatten daha fazla olmamasına özen gösterildi.

**Oositlerin kazanılması ve olgunlaştırılması:** Laboratuvara getirilen ovaryumlar 30-35°C ısıda serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile yıkandı ve işlem süresince bu solüsyon içerisinde bırakıldı. Ovaryumların yüzeyi bistüri ile değişik yönlerde kesildi ve bu kısımlar, içinde %1 oranında FCS (Fetal Calf Serum; Biochrom, S0115) bulunan %0.9 NaCl ile bir saat camına yıkandı. Yıkantı sıvısı stereo mikroskop altında değerlendirilerek en az 4 sıra kompakt kumulus hücre kitlesi ve homojen vitellusa sahip oositler olgunlaştırma amacıyla seçildi. Seçilen oositler, içerisinde %10 oranında FCS ilaveli %0.9 NaCl bulunan mini petri kutularında (Greiner; 627 160) 3 kez pasajlandı ve rastgele 4 gruba bölünerek olgunlaşma medyumlarına alındı:

Grup 1: %20 oranında koyun serumu, 10 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH ve 1 µg/ml estradiol 17 b ilaveli TCM 199,

Grup 2: % 20 oranında koyun serumu ilaveli TCM 199,

Grup 3: 10 µg/ml FSH, 10 µ/ml LH ve 1 µg/ml estradiol 17β ilaveli TCM 199, ve

Grup 4: hormon ve serum ilavesi olmayan TCM 199 medyumları kullanıldı.

Oositler %5 CO<sub>2</sub>, %100'e yakın nem ve 39°C (±0.5°C) ısının sağlandığı inkübatörde 26 saat inkübe edildi.

**Oositlerin fertilizasyonu:** Fertilizasyon amacıyla taze koç sperması kullanıldı. Elektro-ejakülatör yöntemi ile 2-3 koçtan alınan taze koç sperması 3 gruba ayrılarak sırasıyla %2, %5 ve %10 oranlarında koyun serumu ilaveli SOF medyumuna (Sentetik Ovidukt Sıvısı) ile 4:1 oranında sulandırıldı. Sulandırmayı takiben 1000 devirde 6 dakika santrifüje edilen spermada üst kısım atıldı ve kalan kısım tekrar sulandırıldı. Konsantrasyon tayini yapılan sperma, 1 ml.de 2x10<sup>6</sup> spermatozoon olacak şekilde ayarlandı ve olgunlaştırılmış oositlerin üzerine ilave edildi. Her bir olgunlaşma grubu için 3'er

fertilizasyon grubu oluşturuldu. Oosit ve spermatozoonlar %5 CO<sub>2</sub>, %100'e yakın nem ve 39°C (±0.5°C) ısının sağlandığı inkübatörde 18 saat süre ile inkübe edildi.

**Fertilize olmuş oositlerin kültürü:** Fertilizasyon süresini takiben oositler tekrar kendi içlerinde 2'şer gruba ayrıldı ve 1. gruptaki oositler %10 FCS ve koyun ovidukt epitel hücrelerinin ilave edildiği TCM 199 medyumuna içerisine (ko-kültür grubu) alınırken, 2. gruptakiler aynı şartlarda ovidukt epitel hücreleri olmadan kültüre edildi (kültür grubu).

**Tablo 1.** Farklı katkılarla in vitro olgunlaştırılan ve fertilize edilen koyun oositlerinin 6-7 günlük kültürleri sonucu saptanan gelişme dönemleri.

Olgunlaşma Grupları	Fertilizasyon Grupları	Kültür Grupları	Kullanılan Oosit Sayısı	Yarıklanan Oosit Sayısı (%)	Morula Sayısı (%)
Grup 1	%2	Ko-kültür	18	2 (11.1)	2 (11.1)
		Kültür	19	2 (10.5)	1 (5.3)
	%5	Ko-kültür	16	3 (18.8)	2 (12.5)
		Kültür	16	3 (18.8)	1 (6.3)
	%10	Ko-kültür	16	10 (62.5)	7 (43.8)
		Kültür	19	6 (31.6)	2 (10.5)
Grup 2	%2	Ko-kültür	18	6 (33.3)	4 (22.2)
		Kültür	16	4 (25.0)	2 (12.5)
	%5	Ko-kültür	18	5 (27.8)	1 (5.6)
		Kültür	18	7 (38.9)	3 (16.7)
	%10	Ko-kültür	17	9 (52.9)	6 (35.3)
		Kültür	17	4 (23.5)	1 (5.9)
Grup 3	%2	Ko-kültür	20	6 (30.0)	4 (20.0)
		Kültür	20	3 (15.0)	3 (15.0)
	%5	Ko-kültür	19	10 (52.6)	7 (36.8)
		Kültür	19	3 (15.8)	2 (10.5)
	%10	Ko-kültür	21	10 (47.6)	6 (28.6)
		Kültür	19	5 (26.3)	4 (21.1)
Grup 4	%2	Ko-kültür	21	5 (23.8)	4 (19.0)
		Kültür	23	2 (8.7)	1 (4.3)
	%5	Ko-kültür	20	3 (15.0)	2 (10.0)
		Kültür	21	2 (9.5)	1 (4.8)
	%10	Ko-kültür	21	8 (38.1)	5 (23.8)
		Kültür	22	3 (13.6)	2 (9.1)

**Grup 1:** %20 oranında koyun serumu, 10 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH ve 1 µg/ml estradiol 17β ilaveli,

**Grup 2:** % 20 oranında koyun serumu ilaveli,

**Grup 3:** 10 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH ve 1 µg/ml estradiol 17β ilaveli, ve

**Grup 4:** Hormon ve serum ilavesi olmayan TCM 199 medyumuna

Koyun ovidukt epitel hücre kültürünün hazırlanması amacıyla ovaryumlarla aynı gün mezbahadan alınan koyun oviduktları kullanıldı. Oviduktlar civar dokulardan temizlendikten sonra lumenleri yıkandı ve yıkama sıvısı stereo mikroskop altında incelenerek epitel hücre döküntüleri toplandı. İçlerinde %10 oranında FCS ilaveli %0.9 NaCl bulunan mini petri kutularında (Greiner; 627 160) 3 kez pasajlanan epitel hücreleri, %10 oranında FCS ilaveli TCM 199 medyumu içerisinde kültüre edildi. Ovidukt epitel hücre kültürü her parti için tekrar hazırlandı.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde Student *t*-testi ve  $\chi^2$  testleri kullanıldı.

### Bulgular

Çalışmada kullanılan 454 oosit 4 olgunlaşma, 3'er fertilizasyon ve 2'ser kültür grubu olmak üzere toplam 24 gruba rastgele ayrıldı.

Çalışmada 4 ayrı olgunlaşma grubu için sırasıyla 104, 104, 118 ve 128 oosit fertilizasyon ve kültür aşamalarında kullanıldı. Tüm gruplarda elde edilen oosit yarıklanma (cleavage) ve morula oranları Tablo 1'de yer almaktadır.

**Tablo 2.** Olgunlaşma grupları göz önüne alınmaksızın fertilizasyon gruplarına göre elde edilen gelişme dönemleri.

Olgunlaşma Grupları	Kullanılan oosit sayısı	Gelişme Dönemi	
		Cleavage (%)	Morula (%)
Grup 1	104	26 (25.0)	15 (14.4)
Grup 2	104	35 (33.7)	17 (16.3)
Grup 3	118	37 (31.4)	26 (22.0)
Grup 4	128	23 (18.0)	15 (11.7)

Fertilizasyon ve kontrol grupları göz önüne alınmaksızın olgunlaşma gruplarına göre oositlerde saptanan gelişme dönemleri Tablo 2'de sunuldu.

**Tablo 3.** Olgunlaşma ve kültür grupları göz önüne alınmaksızın fertilizasyon gruplarına göre elde edilen gelişme dönemleri.

Fertilizasyon medyumuna katılan serum oranı	Kullanılan oosit sayısı	Gelişme Dönemi	
		Cleavage (%)	Morula (%)
%2	155	30 (19.4)	21 (13.5)
%5	147	36 (24.5)	19 (12.9)
%10	152	55 (36.2)	33 (21.7)

Olgunlaşma grupları göz önüne alınmaksızın fertilizasyon ve kültür gruplarına göre oositlerde saptanan gelişme dönemleri ise sırasıyla Tablo 3 ve 4'te sunuldu.

**Tablo 4.** Olgunlaşma ve fertilizasyon grupları göz önüne alınmaksızın, kültür gruplarına göre oositlerde elde edilen gelişme dönemleri.

Kültür Grubu	Kullanılan oosit sayısı	Gelişme Dönemi	
		Cleavage (%)	Morula (%)
Ko-Kültür	225	77 (34.2) <sup>a</sup>	50 (22.2) <sup>a</sup>
Kültür	229	44 (19.2) <sup>b</sup>	23 (10.0) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>: Dikey sütunlarda farklı harf taşıyan oranlar arasındaki farklar anlamlıdır (p<0.001).

### Tartışma ve Sonuç

Primer koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılması, fertilizasyonu ve kültürü esnasında farklı katkıların denenmesi amacıyla 24 grubun oluşturulduğu bu çalışmada, olgunlaşma sırasında TCM-199 medyumuna ilave edilen serum ve hormonların etkisi incelendi. Hiçbir katkının yapılmadığı grupta (Grup 4) gerek yarıklanma, gerekse morula oranları çok düşük olurken (sırasıyla %18.0 ve %11.7), en yüksek yarıklanma oranı sadece serum katılan grupta (Grup 2), en yüksek morula oranı ise sadece hormonların katıldığı grupta gerçekleşmiş (Tablo 2), gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

İn vitro olgunlaştırılan ve fertilize edilen koyun oositlerinin yarıklanma (cleavage) ve morula oranları üzerine fertilizasyon medyumuna katılan serum oranının etkisi incelendiğinde, olgunlaşma grupları göz önüne alınmaksızın, %2, %5 ve %10 serum katılan gruplarda cleavage geçiren ve morula dönemine ulaşan oosit oranları sırasıyla %19.4, %24.5 ve %36.2; ve %13.5, %12.9 ve %21.7 olarak saptandı (Tablo 3). Gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz bulundu (p>0.05).

Koyun ovidukt epitel hücreleri ile ko-kültürün etkisi incelendiğinde, olgunlaşma ve fertilizasyon grupları göz önüne alınmaksızın, ko-kültür uygulanan gruptaki cleavage oranı %34.2, uygulanmayan grupta ise %19.2 olarak saptanmış (Tablo 3), oranlar arasındaki fark çok ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur (p<0.001). Aynı şekilde ko-kültür uygulanan grupta %22.2 oranında oosit morula dönemine gelişirken, uygulanmayan grupta ise bu oran %10.0 olarak saptanmış (Tablo 3) ve bu oranlar arasındaki fark çok ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur (p<0.001).

Fertilizasyon medyumunu olarak %20 SES katkılı TL medyumunu kullanan Byrd ve ark. (1), %20.26 oranında embriyonun morula, %4.01 oranında embriyonun ise blastosist dönemine ulaştığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada en yüksek oranda (%10) serum katkılı fertilizasyon medyumunun kullanıldığı grupta elde edilen morula oranı (%23.0), araştırmacıların morula oranına benzer olmuş, fakat sunulan çalışmada blastosist dönemine ulaşamamıştır.

Fertilizasyon medyumunu olarak %2 SES katkılı SOF medyumunu kullanan O'Brien ve ark. (10), puberteye ulaşmamış koyunların oositleri ile yaptıkları çalışmada cleavage oranını %81.9, erişkin koyunların oositleri ile yaptıkları çalışmada cleavage oranını ise %82 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı şekilde gruplara göre sırasıyla %15.4 ve %34.1 oranında blastosist elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bu oranlar sunulan çalışmada tüm gruplarda elde edilen oranlardan oldukça fazladır.

Walker ve ark. (16), %2 ve %20 SES katkılı SOF medyumunu fertilizasyon medyumunu olarak kullanmış ve bu gruplarda sırasıyla %71.3-72.9 ve %27.2-40.9 oranlarında cleavage elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacıların %2 serum kullandıkları grupta elde ettikleri oranlar sunulan çalışmada aynı miktarda serum katılan grupta saptanan orandan oldukça fazla olurken, sunulan çalışmada %10 serum katılan grupta elde edilen oran ise araştırmacıların %20 serum katkısı ile saptadıkları oranlara benzer olmuştur.

Fertilizasyon amacıyla %20 SES katkılı DMH medyumunu kullanan Sevellano ve ark. (13), elde ettikleri cleavage, morula ve blastosist oranlarını sırasıyla %70.4, %56.3 ve %13.6 olarak bildirmişlerdir. Bu oranlar sunulan çalışmada saptanan oranların oldukça üzerindedir.

Walker ve ark. (16), koyundaki in vitro olgunlaştırma / in vitro fertilizasyon çalışmalarından genellikle %50-70 arasında cleavage oranları elde edildiğini, oositlerin %30-40'ının ise blastosiste geliştiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmadaki 24 grupta elde edilen cleavage oranları (%8.7-62.5) oldukça değişken olmasına rağmen, bazı gruplarda elde edilen oranlar tatminkar olmuştur (Tablo 1).

Crozet ve ark. (4), ısı ile inaktive edilmiş östrustaki koyun serumunun (SES) koyun oositlerinin in vitro fertilizasyonunu destekleyici etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar özellikle kapasitasyon ve fertilizasyon medyumlarında %20 oranında SES mevcudiyetinin fertilizasyon oranını oldukça artırdığını belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada da fertilizasyon medyumuna %2, %5 ve %10 oranında katılan SES'nun miktarı arttıkça cleavage ve morula oranlarının arttığı görülmüştür.

Çalışmalarında 3 ayrı kültür ortamı deneyen (1: %20 koyun serumu katkılı SOF medyumunda IVF ve IVC; 2: %20 serum katkılı SOF medyumunu+somatik hücre ko-kültürü ile birlikte IVF ve IVC; 3: 2. gruptaki gibi IVF ve koyun oviduktunda in vivo kültür) Holm ve ark. (5), bu 3 farklı kültür ortamının in vitro olgunlaştırılmış ve fertilize edilmiş koyun oositlerinin morula ve blastosist oranlarını etkilemediğini, fakat kültüre ve transfer edilen embriyolojik dönemin buzağılama oranları üzerine önemli bir etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise ko-kültür uygulaması cleavage ve morula oranlarını önemli ölçüde artırmıştır ( $p<0.001$ ).

Byrd ve ark. (1), sığır ovidukt epitel hücre ko-kültürü kullandıkları çalışmalarında morula oranını %20.26 olarak bildirmişlerdir. Ko-kültür yerine %0.3 BSA katkılı SOF medyumunu ile kültürü deneyen O'Brien ve ark. (10) ise, %34.1 oranında blastosist dönemine ulaşıldığını belirtmişlerdir. Madan ve ark. (6), kültür için %1 SES katkılı TCM medyumunu ve kumulus hücre monolayer'i kullanmışlar ve kültür sonucu %37.6 oranında morula dönemine ulaşıldığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ko-kültür uygulanan gruplardaki morula oranları ise %5.6-43.8 arasında değişmektedir.

Naqvi ve ark. (9) ko-kültür uyguladıkları grupta %28.1, uygulanmayan grupta ise %16.8 oranında morula dönemine ulaşıldığını ve aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum sunulan çalışmada elde edilen verilerle uyumludur.

O'Brien ve ark. (11) FSH, LH veya östradiol ilavesinin blastosist oluşumuna veya elde edilen embriyolardaki hücre sayısı üzerine bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Keçilerde benzer bir çalışma yapan Mogas ve ark. (8) ise, olgunlaşma medyumunda yüksek konsantrasyonlarda hormon kullanımının in vitro fertilizasyon ve embriyo gelişimini artırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan hormonların cleavage ve morula oranları açısından bazı gruplarda iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir (Tablo 1).

Sonuç olarak, koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında %20 oranında SES ve hormonların kullanılması, fertilizasyon medyumuna %10 oranında SES ilavesi ve fertilizasyon sonrası koyun ovidukt epitel hücreleri ile ko-kültürün kullanımı ile en iyi cleavage (%62.5) ve morula (%43.8) oranlarının elde edildiği ve bu oranların dünyada yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu söylenebilir. Bununla beraber çalışmada blastosist dönemine ulaşamaması kültür medyumunda bazı eksikliklerin olduğunu düşündürmektedir. Bu durumun önüne geçilebilmesi için kültür medyumuna ilaveleri konusunda daha fazla çalışma yapılması gerekli görülmektedir.

#### Kaynaklar

1. Byrd, S.R., Flores-Foxworth, G., Applewhite, A.A. and Westhusin, M.E. (1997): In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology*, 47; 857-864.
2. Cognie, Y., Guerin, Y., Guyader, C., Poulin, N. and Crozet, N. (1990): In vitro fertilization of sheep oocytes matured in vivo. In: fertilization in mammals. Eds. B.D. Bavister, J. Cummins, E.R.S. Roldan. Sero Symposia, USA.
3. Cox, J.F. (1991): Effect of the cumulus on in vitro fertilization of in vitro matured cow and sheep oocytes. *Theriogenology*, 35; 191 (Abstr.).
4. Crozet, N., Ahmed-Ali, M. and Huneau, D. (1992): Estrous-sheep serum as a potent agent for ovine and caprine IVF. 12th. Int.Cong. on Anim. Repr., 1; 426-428.
5. Holm, P., Walker, S.K., Petersen, B.A., Ashman, R.J. and Seamark, R.F. (1994): In vitro vs. in vivo culture of ovine IVM-IVF ova: effect on lambing. *Theriogenology*, 41; 217 (Abstr.).
6. Madan, M.L., Naqvi, S.M.K., Chauhan, M.S., Singla, S.K. and Manik, R.S. (1992): In vitro production of ovine preimplantation embryos from in vitro matured oocytes using epididymal and frozen thawed spermatozoa. 12th. Int. Cong. on Anim. Repr., 3; 1318-1320.
7. Meinecke-Tillmann, S. and Meinecke, B. (1992): Establishment in culture of embryonic cell lines from small domestic ruminants. 12th. Int.Cong. on Anim. Repr., 2; 718-720.
8. Mogas, T., Izquierdo, M.D., Palomo, M.J. and Paramio, M.T. (1995): Effect of hormones, serum source and culture system on the IVM and IVF of prepubertal goat oocytes and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 43; 284 (Abstr.).
9. Naqvi, S.M.K., Madan, M.L., Manik, R.S., Chauhan, M.S. and Singla, S.K. (1992): In vitro development of ovine oocyte matured and fertilized in vitro to compact morula in co-culture system of oviductal cells and conditioned medium. 12th Int. Cong. on Anim. Repr., 3; 1327-1329.
10. O'Brien, J.K., Catt, S.L., Ireland, K.A., Maxwell, W.M.C. and Evans, G. (1997): In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology*, 47; 1433-1443.



11. O'Brien, J.K., Rhodes, S.L., Maxwell, W.M.C. and Evans, G. (1994): Hormonal requirements for in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*, 41; 266 (Abstr.).
12. Palomo, M.J., Mogas, T., Izquierdo, M.D. and Paramio, M.T. (1995): Effect of heparin and sperm concentration of IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 43; 292 (Abstr.).
13. Sevillano, C., Anel, L., De La Fuente, J., Alvarez, M., Celorrio, I., De Paz, P., Boixo, J.C. and Olmedo, J.A. (1997): In vitro development of sheep embryos derived of repeated laparoscopic folliculoaspiration. *Theriogenology*, 47; 298 (Abstr.).
14. Stojanov, T., Robinson, S.J., Rhodes, S.L., O'Brien, J.K., Evans, G. and Maxwell, W.M.C. (1994): In vitro fertilization with chilled-stored ram spermatozoa. *Theriogenology*, 41; 302 (Abstr.).
15. Tervit, H.R., Pugh, P.A., McGowan, L.T., Bell, A.C.S. and Wells R.W. (1994): The freezability of sheep embryos is affected by culture system and source (in vivo or in vitro derived). *Theriogenology*, 41; 315 (Abstr.).
16. Walker, S.K., Hill, J.L., Bee, C.A. and Warnes, D.M. (1994): Improving the rate of production of sheep embryos using in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*, 41; 331 (Abstr.).