

SİĞIRLARDA İN VİTRO OOSİT MATURASYONU

(DERLEME)

(In vitro Maturation of Bovine Oocytes) (A Review)

Numan AKYOL¹

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

ÖZET

Bu derlemede, in vitro koşullarda sığır embriyosu elde edilmesinde önemli bir adım olan in vitro oosit maturasyonuna etki eden faktörler konu edilmiştir.

Anahtar kelimeler : Sığır, Oosit, İn vitro maturasyon

SUMMARY

In vitro maturation is an important step for in vitro production of bovine embryos. In this review, how to realize in vitro bovine oocytes maturation and factors affecting on this procedure were discussed.

Key Words : Bovine, Oocyte, In vitro maturation

GİRİŞ

Hayvansal biyoteknoloji konusunda sağladığı büyük avantaja rağmen pek çok laboratuvarında in vitro sığır embriyosu elde etme oranı %25-50 arasında kalmaktadır. Bunun başlıca nedeni kültür koşullarının ve in vitro oosit maturasyonunun önündeki problemlerin aşılanamış olmasındandır. Henüz başarı düzeyi tatmin edici olmasa da in vitro fertilizasyon konusu, gelişmiş ülkelerin pek çoğunda hayvan ıslahı dalındaki yerini çoktan almıştır. Hayvansal gıdalardan yararlanma oranının gelişmiş ülkelere kıyasla oldukça düşük kaldığı ülkemizde, hayvansal protein açığını kapatmak için bu gibi tekniklerin hayvancılığa verebileceği katkılar göz ardı edilmemelidir. Bu çalışmada, in vitro oosit maturasyonuna etki eden faktörler irdelenerek bu konuyla ilgilenen araştırmacılara faydalı bilgiler verilmeye çalışılmıştır.

Oosit Maturasyonu

Sığır oositi, nükleer ve sitoplazmik maturasyon evrelerinden geçerek fertilizasyona hazır hale gelir. Nükleer maturasyon, oosit nükleusunun germinal vezikül aşamasından metafaz-2 (M-II) safhasına ulaşması durumudur. Bu gelişim, germinal vezikül yıkılmasından (Germinal Vesicle Break Down-GVBD), kro-

mozom kondenzasyonu, birinci metafazın iğiplikçiklerinin oluşumu, homolog kromozomların polar cisimcik vasıtasıyla atılması ve M-II durumuna geçilmesi olgularını kapsar. Ardından da redüksiyon bölünmesiyle birlikte kromozom sayısı haploid ($n=30$) duruma gelir (31).

Sitoplazmik maturasyon ise, oositin GV safhasından M-II safhasına, olgun bir oosit oluncaya kadar geçirmiş olduğu ultrastrüktürel değişimleri ifade eder. Bu değişimler, oositin normal fertilizasyonu, bölünmeye başlaması ve blastosist safhasına kadar ulaşmasında indirekt olarak etkilidir.

Maturasyonu destekleyici faktör (Maturation Promotion Factor-MPF), mayoz kilitlenmesi (Meiotic Arrest), foliküler apoptozis, inhibitörler, foliküler sıvı oositin in vivo maturasyonunu az ya da çok etkileyen faktörler arasındadır.

İn vitro Maturasyona Etki Eden Faktörler

Oosit Vericisinin Fizyolojik Durumu

Pubertaya ulaşmış düveler oosit vericisi olabilir. Bunun için tek gereksinim, ovaryumlarda antral foliküllerin bulunmasıdır.

Hipoplastik ovaryumlara sahip, postpartum dönemde olan ve doğuma çok az bir süre kalmış hayvanların donör olarak kullanılması uygun değildir. Sayı ve kalite olarak vericilerden toplanan oositlerde büyük farklılık vardır. Bunun nedeni vericilerin genetik karakterleri, bakım ve beslenme şartlarındaki farklılıklardır. Sağlık durumları, çevresel koşulları ve beslenme şartları iyi olan vericilerden toplanan oosit sayısı ve kalitesi yüksek olmaktadır (17).

Hayvanlardan puberta öncesi oosit toplanabilirse de elde edilen oositlerde henüz yeterli düzeyde hormon reseptörü bulunmayışından dolayı bunların maturasyon yetenekleri sınırlı kalmaktadır (39). Sıcaklık stresi altındaki sığırların ovaryumlarından elde edilen oositlerin, maturasyon ve embriyo oluşturma yetenekleri sınırlı kalmaktadır (3).

Östrus Siklusu ve Foliküler

Dalgalanma

Ovaryumlardan toplanan oosit miktarı, bunların gelişim ve fertilizasyon yetenekleri seksüel siklusun evreleriyle yakından ilgilidir. Örnek olarak, ovaryumda korpus luteum bulunması durumunda en yüksek oranda, korpus luteum ile birlikte dominant folikül bulunması durumunda daha düşük oranda oosit toplanmıştır. Yalnızca dominant folikülün yer aldığı ovaryumlardan toplanan oosit sayısı en düşük seviyede kalmıştır (55). Atrezi safhasına giren foliküllerin in vitro gelişim kapasiteleri düşük olmaktadır. Bu bakımdan, henüz foliküler fazda yani atrezi dönemine girilmeden önceki safhada oosit toplanmasının daha çok maturasyon oranı sağladığı söylenebilir (22, 26, 37).

Folikül Büyüklüğü

İn vitro embriyo üretimi amacıyla 2-6 mm çapındaki foliküller kullanılır. Antral foliküllerden çapı 2 mm'ye kadar olanlarda gelişim için gerekli mikro çevre şartları henüz

oluşmadığından maturasyon yetenekleri çok düşüktür. Bunun bir nedeni de büyüme sürecinde olan oositin yeterli düzeyde RNA sentezi yapamamış olmasıdır (1).

Folikül büyüklüğünün artmasıyla maturasyon yeteneği artmaktadır. Ancak folikül büyüklüğü, oositin kaliteli embriyo haline gelmesi için tek ölçüt değildir. Büyük bir folikül zayıf gelişim kabiliyeti gösterebildiği gibi orta büyüklükte bir folikül de iyi bir gelişim gösterebilmektedir (48). Araştırmacılar arasındaki yaygın kanaat folikül büyüdükçe gelişim yeteneklerinin arttığı yönündedir. Büyük foliküllerin sitoplazmik maturasyonu tamamlamış olmaları buna en büyük gerekçedir (34, 42).

Kumulus Oosit Kompleksi (COC)

Granuloza ve teka hücreleri mayotik dinlenme süreci içinde oositin ihtiyaçlarının karşılanmasına, maturasyona başlayan oositlerin gelişim kabiliyeti kazanmasına yardım ederler. Granuloza hücreleriyle birlikte oosite Kumulus Oosit Kompleks (COC) denmektedir (51). Bütün bu hücreler ve oosit parakrin, otokrin hormonlar ve büyüme faktörleri sayesinde indirekt olarak ilişki halindedirler. Ayrıca kumulus hücreleri ile oosit, gap junction adı verilen ve birbirine çok yakın hücreler arasında iyon geçişinin sağlandığı özel bölgeler sayesinde direkt olarak bağlantı halindedir (22).

Kumulus hücreleri, oositin yeterli gelişim kapasitesine ulaşması ve beslenmesi açısından kritik role sahiptir. İmmature oositte glutasyon oranı düşüktür. Bu oran maturasyon süreci içerisinde yükselir ve ikinci metafaz safhasında en yüksek seviyesine ulaşır. Glutasyon, spermatozoon kromatinlerinin dekondenzasyonu ve histonlar tarafından protaminlerin yer değiştirmesi süresince disülfit bağlarının azaltılmasından sorumludur. Ayrıca kumulus hücreleri RNA sentezinde regülatör bir role sahiptir (20, 25).

Oosit Kalitesi

Doğru oosit seçimi in vitro embriyo üretiminde başarının anahtarı durumundadır (Tablo 1).

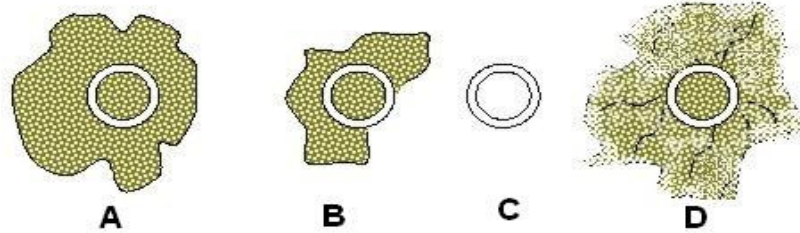
Bazı araştırmacılara göre oosit, kumulus hücreleri ve oosit sitoplazması birlikte değerlendirmeye alınır. Buna göre, (1, 2, 3, 4) şeklinde dört farklı sınıflama yapılır. Yalnızca kumulus hücrelerinin morfolojik durumuna bakılarak A, B, C ve D şeklinde de sınıflandırma yapılmaktadır. Bu sınıflamalara göre yalnız dördüncü grup çok düşük in vitro maturasyon yeteneğindedir. Homojen

görünümlü bir sitoplazma, oositi çevreleyen, bozulmamış ve kompakt yapıda kumulus hücreleri, immature oositin maturasyon ve embriyonik gelişim yeteneğinin en önemli işaretlerindedir (10, 25) (Şekil 1).

Bazı araştırmacılar ise, sitoplazması homojen görünüşte, zona pellusidaya sıkıca tutunmuş ve kompakt yapıda kumulusa sahip oositleri “Gelişime uygun”, heterojen sitoplazmalı ve ekspansive olmuş kumulus hücrelerine sahip oositleri de “gelişime uygun olmayan” oositler şeklinde sınıflandırmaktadırlar (57).

Tablo 1. Kumulus Morfolojisine göre sınıflandırılan oositlerin bölünme yetenekleri (47)

Kategori	Maturasyona alınan	Bölünen	Bölünme oranı
A	364	232	63.7
B	122	36	29.5
C	158	28	17.7



Şekil 1. Kalite sınıflandırmasına göre şematik COC görünümleri

Maturasyon Süresi

İn vitro maturasyona alınan immature sığır oositlerinde 0-6.6. saatlerde GV oluşumu, 6.6-8.0. saatlerde germinal vezikül yıkımı (GVBD), 8.0-10.3. saatlerde kromozom dekon-denzasyonu, 10.3-15.4. saatler arasında birinci metafaz, 15.4-18.0. saatler arasında birinci anafaz ile telofaz ve 18.0-24.0. saatler arasında da ikinci metafaz aşamaları geçilir. GVBD ve birinci polar cisimciğin atılması, kumulus hücrelerinin ekspansiyonu ile yakından ilişki-

lidir. İnek oositlerinin in vitro maturasyonun-da, maturasyon zamanı olarak 18 saatten 27 saate kadar değişik süreler bildirilmekle birlikte çoğunlukla 22-24 saat kullanılmaktadır (1, 8, 20).

Sıcaklık, Nem ve Çevresel Gaz Bileşimleri

GVBD ve birinci metafazın son safhaları oosit maturasyon sürecinde en hassas

dönemlerdir. Düşük sıcaklık düzeylerinde mayoz iğ iplikçiklerinin oluşumu durmaktadır. İn vitro maturasyon süreci içerisinde, 39°C'ye yakın sıcaklık değerlerinde normal iğ iplikçikleri morfolojisinin korunduğu ve maturasyon oranının optimum olduğu bildirilmektedir (41). İnkubatör ortamında, maturasyon mediumunun evaporasyonla derişiminin ve pH sınırn değişmemesi amacıyla çevresel nemin % 95'in üzerinde olması gerekir (39).

Oksijen, memeli hücrelerince enerji üretimi için esansiyel öneme sahiptir. Kültür ortamlarında kullanılan oksijen miktarına bir de hücrelerce üretilen, süperoksit, hidrojen peroksit, ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijenler eklendiğinden, bu hücreler oksidatif strese maruz kalmaktadırlar. Reaktif oksijenler, lipit peroksidasyonu vasıtasıyla membran bozunması, enzim inaktivasyonu, DNA'larda yapısal hasarlar yapar ve sonuçta hücre ölümüne neden olurlar. Yaygın olarak kullanılan %5 CO₂ ve hava sistemlerinde, yaklaşık olarak %20 kadar oksijen bulunmaktadır. Bu oran pek çok memeli embriyosunun gelişiminde olumsuz bir etki yapar. Oosit maturasyonu için yüksek konsantrasyondaki oksijenin, oositler üzerindeki olumsuz etkisini azaltmak amacıyla konu edilen gaz ortamına alternatif olarak %5 CO₂, %5 O₂ ve %90 N₂ bileşimi kullanılmaktadır. Yüksek oksijen konsantrasyonu oosit maturasyonunu bloke etmektedir. Bu bakımdan in vitro kültür koşullarında %20 oksijen oranı yüksek kabul edilmekte ve %5-10 oksijen düzeylerinin en uygun maturasyon oranı sağladığı kaydedilmektedir (52, 54).

Maturasyon Ortamlarının Ozmotik Deęeri

İN vitro kültür şartlarının oosit için optimum olması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan mediumların ozmotik basıncı, vücut sıvılarının sahip olduğu değere (308 mOsm) yakın olarak hazırlanmalıdır. Hiperozmotik maturasyon mediumu içerisinde kültürün

ardından belirgin oranda dejenere oosit varlığı gözlenmektedir. Bu tür oositler düzensiz kromozom morfolojisi, düzensiz ve transparent bir sitoplazma ile karakterize olurlar. Düşük ozmotik seviyelerde ise ikinci polar cisimcik oluşumunun baskılanması ve ilk bölünmenin gecikmesi söz konusu olmaktadır (5). Ozmotik basınç, sığır oositlerinin germinal vezikül ve ikinci mayoz safhalarında gelişim yetenekleri üzerinde önemli derecede etkilidir (2). Yüksek osmolariteye sahip mediumlarda oosit inkubasyonu sonucu, oositin gelişim yeteneğinin önemli oranda düştüğü görülmüştür. Oositin canlılığını devam ettirebilmesi bakımından mediumların uygun osmolaritede hazırlanması gerekir (18, 32).

İN vitro Maturasyon Sistemleri

Oositler, maturasyon mediumlarına değişik şekillerde yerleştirilerek inkube edilmektedir. Genel olarak bu amaçla; 35 mm petri kutularında 50-100µl medium/ 10-20 oosit tarzı kullanırken, pH'ın daha stabil tutulabildiği 600µl medium/100 oosit tarzı da kullanılmaktadır (25).

Bazı araştırmacılar ise; 2ml medium/20 oosit oranının kullanıldığı "statik flaks sistem" adı verilen yöntemleri tercih etmektedirler. Aslında statik sistemler ko-kültürün kullanılmadığı, statik olmayan sistemler ise foliküler hücrelerin ko-kültür amacıyla kullanıldığı sistemler olarak bilinir (39).

Maturasyon İçin Kullanılan Mediumlar

Yapılan çalışmalar, mediumun oosit maturasyonunda özel öneme sahip olduğunu göstermektedir. Maturasyon amacıyla kullanılan medium, yalnızca sığır oositlerinin ikinci metafaza ulaşmasına değil, aynı zamanda normal fertilizasyon gerçekleştirebilecek yeteneğe ulaşmasına ve embriyo oluştuktan sonra gösterdiği gelişim performansına da etki etmektedir (6).

Sığır oositlerinin maturasyonunda kullanılan mediumlar, basit (simple) ve kompleks (complex) olarak sınıflandırılır. Basit maturasyon mediumları, bikarbonat tampon sistemlerinin kullanıldığı temel fizyolojik tuzlardan oluşan sistemlerdir. Bunlara piruvat, laktat tuzları ve glukoz da ilave edilebilir (1).

Kompleks maturasyon mediumları, basit medium içeriklerine ilave olarak amino asitler, vitaminler, pürinler ve serum içerisinde mevcut diğer substansları içermektedirler. Kompleks maturasyon mediumlarından en yaygın olarak kullanılanı TCM-199'dur (Tissue Culture Medium). TCM-199 içerisine HEPES (N-2-hidroksietil- piperazin-N'-2-etanosülfonik asit) ve bikarbonat tamponlar katılabilmektedir. Ham's F-10, Menezo-B2 mediumu ise kompleks maturasyon mediumlarına verilecek diğer yaygın örneklerdir (9, 28).

Gerek basit, gerekse kompleks maturasyon mediumlarında ortak nokta, oositin temel düzeyde ihtiyaçlarının karşılanmasıdır. Bütün maturasyon mediumların hazırlanması için kullanılması gereken su, ilk ve en önemli basamağı oluşturur. Bu amaçla en başta, her türlü mikroorganizma kontaminasyonundan, hücrelere zarar verebilecek, katı, sıvı ve gaz formundaki yabancı maddelerden uzak olması şarttır. Hücre kültürü amacıyla bütün bu sayılanları ultra saf su ile elde etmek mümkündür. Medium yapımına uygun en yüksek kalitede saf suyun elde edilmesi amacıyla, saflaştırma, distilasyon, deionizasyon, revers ozmoz, adsorbsiyon ve ultrafiltrasyon gibi bir seri işlem gerekir ve elde edilen suyun elektrik iletkenliği yaklaşık $0.06 \mu S^{-1}$ olmalıdır (20).

Maturasyon Mediumuna Yapılan Katkılar

1.Hormon Katkıları

Gonadotropik Hormonlar

Gonadotropik hormonların oosit maturasyonu, fertilizasyonu ve erken embriyo gelişimi üzerine olan etkileri farklıdır. LH, oosit maturasyonunu değil, daha çok in vitro fertilizasyon sonrası erken embriyonik gelişim yeteneğini artırmaktadır (15, 59). Nakagawa ve Leibo (41), tek başına LH'nin kullanıldığı durumlarda maturasyon oranının önemli düzeyde arttığını vurgulamıştır.

Kültür ortamına katılan LH oositin besinsel çevresini değiştirmekte ve kumulus hücrelerinin yardımıyla oositin glukoz kullanımı artırmaktadır. Yani glukoz bulunan maturasyon ortamında pirüvik asit yapımını körüklemektedir. Yükselen mitokondriyal glikoz oksidasyonunun ardından hücrede glikolizis uyarılmaktadır. LH oosit içinde glutamin metabolizmasını da hızlandırmaktadır. Bütün bu olayların gerçekleşebilmesi için oositle birlikte kumulus hücrelerinin (COC) olması gerekir çünkü, LH etkisini gösterebilmek için teka hücrelerinde mevcut LH reseptörlerine ihtiyaç duyar (59).

FSH, granuloza hücrelerindeki aromataz aktiviteyi canlandırarak foliküler mikroçevrenin androjen karakterden östrojene dönüşmesini sağlar. FSH'nin, in vivo koşullarda ovaryumdan östrojen ve inhibin salınımını uyardığı bilinmektedir. Ancak in vitro şartlarda FSH'nin bu işlevi oldukça düşüktür. FSH'nin in vitro maturasyonda, en büyük rolünün kumulus hücre ekspansiyonu ve sperm kapasitasyonu ile fertilizasyon aşamasında olduğu kaydedilmektedir. Maturasyon mediumuna katılan FSH erken embriyonik gelişim aşamasında daha etkili olurken, mayotik gelişimde ve fertilizasyonda da etkili olmaktadır (13).

Oosit maturasyonu amacıyla daha çok FSH ve LH kombinasyonu kullanılmakta ve pek çok araştırmacı, bunların mediuma katılması halinde iyi derecede maturasyon ve fertilizasyon sonucu aldıklarını bildirmektedirler (7, 16, 29).

Östrojen 17-β (E₂) ve Progesteron

İn vitro oosit maturasyonunun uyarılması amacıyla, kültür ortamına östrojen ve progesteron katılmaktadır. Sinerjik etkileri bakımından çoğunlukla gonadotropinlerle birlikte kullanılmaktadırlar (36).

Östradiol 17-β (E₂), in vitro koşullarda epitel mitogenezis, sekretorik protein yapımı, apoptozis gibi durumlarda epitel hücrelerinin başkalaşım seyri ve epitel hücrelerinin sahip oldukları progesteron reseptörleri üzerinde düzenleyici rol oynarlar. Hedef organlardaki etkisini reseptörler yardımıyla gerçekleştirir. Epitel proliferasyonunda, E₂ ile birlikte büyüme faktörleri de (GF) gelişim sürecine dahil olurlar ve epidermal büyüme faktörlerinin (EGF) ve onların reseptörlerinin sayıca artmasını sağlarlar (12).

Foliküler gelişim ve ovulasyonda, östradiolün önemli rol oynadığına inanılır. Granuloza hücrelerinin gonadotropinlere karşı cevabıyla steroid sentezi artmakta, bu da folikül hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Ovulasyon LH yükselişi, oositin folikül içerisinde mayotik maturasyonunu başlatır. Ovulasyonun ardından östradiol düzeyi zamanla düşmeye ve progesteron düzeyi artmaya başlar. Oosit maturasyonu için östradiol/progesteron dengesinin büyük önemi vardır. Östradiol, oosit maturasyonuna olan olumlu etkilerinden dolayı doğrudan ya da dolaylı olarak maturasyon mediumuna ilave edilmektedir. Proöstrus ve östrustaki inek ve düvelerin serumlardaki E₂'den dolayı olarak yararlanmak amacıyla elde edilen bu serumlar kültür ortamına %5-10-20 oranlarında veya hazır östradiol preparatları, 1µg E₂/1ml maturasyon mediumu olacak şekilde katılabilirler. Daha yüksek E₂ düzeyinin iğ iplikçikleri ve polar cisim oluşumuna zıt etkide olduğu belirtilmektedir (20).

İn vitro maturasyon mediumuna östradiol katılması, sığır oositlerinin nükleer ve sitoplazmik maturasyonunu artırmaktadır. LH ve FSH ile birlikte kullanıldığında ise maturasyon, fertilizasyon ve 4-8 hücreli embriyo oluşumuna yardımcı olmaktadır. Adı geçen etkiler, önemli oranda maturasyona alınan oositlerin kompakt kumulus yapısına sahip olmasına bağlıdır (16, 57).

Prolaktin

Prolaktin hormonu, maturasyon mediumunun bileşimine bağlı olarak, in vitro oosit mayozunu desteklemektedir. Bu hormon, erken gelişim dönemindeki oositte, Ca⁺⁺ seviyesini kontrol ettiğinden bazı kromozom dejenerasyonlarını da önlediği bildirilmektedir (27).

Büyüme Faktörleri (Bovine Somatotrophin)

Maturasyon mediumuna katılan büyüme hormonu, granuloza hücreleri tarafından üretilen insülin benzeri büyüme faktörünün miktarını yükselterek etkili olmakta ve oositin sitoplazmik maturasyon yeteneğini artırmaktadır (24).

Yaygın olmamakla birlikte, sığır oositlerinin in vitro maturasyonunun desteklenmesinde, Tiroit Uyarıcı Hormon (TSH), insülin, oksitosin, follistatin, aktivin ve inhibin gibi hormon katkılarının yanı sıra, erkek pronükleus oluşumunu destekleyen ve glutasyonun bir alt komponenti olan sistein (cysteine) kullanılmaktadır. Bu katkı maddelerine ilave olarak, sitokinler (cytokins), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), ticari sürfaktantlar gibi onlarca katkı maddesi de bu amaçla maturasyon mediumlarına ilave edilmektedir (33, 38, 53). Maturasyon mediumuna katılan insülin, kumulus hücrelerinden sperm kapasitasyonuna neden olan biyolojik ürünlerin salınmasını uyararak fertilizasyon oranını artırmaktadır (30).

2. Protein (Serum ve Albumin)

Katkıları

Kültür ortamlarına serum ve BSA katılması oositlerin maturasyonuna yardımcı olmaktadır. İn vitro fertilizasyon prosedüründe en çok kullanılan protein kaynağı sığır serumu ve sığır serum albuminidir (BSA) (19, 43).

BSA, makromolekül düzeyinde gelişim komponentlerini içeren ve kristalize halde kullanılan bir üründür. Değişik fraksiyonları bulunmakla birlikte kültür medium katkısı olarak V-fraksiyonu kullanılmaktadır. Ancak pürifiye BSA veya yağ asitlerinden arındırılmış (Fatty acid free) BSA veya tavuk yumurtası albumini embriyo gelişimi açısından daha iyi sonuç vermektedir. BSA içerisinde düşük molekül ağırlığına sahip bileşenlerin olması oosit maturasyonunu olumsuz etkiler. BSA'nın kültür süresince oosit üzerinde oynadığı rol henüz aydınlanmamıştır. Bununla birlikte bilinen birkaç görevi, ağır metalleri albumin şelatlarına dönüştürmesi ve pH tamponu olmasıdır. BSA kullanımıyla oluşan bu olumsuzluklar, Polivinil pirrolidon (PVP-40) gibi sentetik makromoleküllerin kullanımıyla giderilebilir (4).

İn vitro maturasyonda fetal buzağı serumunun (FCS), BSA'dan daha üstün olduğu kabul edilir, bununla birlikte LH ve östrustaki inek serumu (ECS) ile birlikte kullanılması durumunda elde edilen fertilizasyon oranının hayli yüksek olduğu, östrustaki inek serumu katkısıyla da ilk bölünme oranının önemli ölçüde arttığı bildirilmektedir (46, 58).

Serumlar, maturasyon ortamlarına; fetal buzağı serumu (Fetal Calf Serum-FCS), proöstrus dönemindeki inek serumu (Proestrus Cow Serum-PECS), süperovulasyon oluşturulmuş inek serumu (Superovulated Cow Serum-SCS), kastre öküz serumu (Steer Serum-SS) olarak katılabilmektedir. Serum kaynağı olarak

fötüs, yeni doğan buzağı ve seksüel siklusunun değişik evrelerinde olgun inek ve düveler kullanılabilir. Ancak bu değişik dönemlerde, hayvanlardan elde edilen serum içeriği özellikle de hormon düzeyleri doğal olarak farklı olmaktadır. Örneğin fötusta kan parametreleri anne ile büyük oranda benzeşmektedir. Buzağı serumunda E₂ içeriği doğumdan hemen sonra 28 pg/ml olurken, doğum gerçekleşikten bir hafta sonra E₂ oranındaki düşüş en belirgin seviyesine ulaşır ve 0.52 pg/ml olarak ölçülür. Buzağı yaklaşık 6 haftalık yaşındayken, plazma E₂ düzeyinde bir yükseliş daha gözlenir ve yaklaşık 1-2 pg/ml olur (40).

Serum kaynağı olarak kullanılan bütün hayvanlar, hastalıklardan arı olmalıdır. Bu hayvanlarda serumun bileşimini dolayısıyla oosit maturasyonunu olumsuz etkileyecek medikal uygulamalar yapılmamalıdır. Serumlara, kullanımlarından önce, 56°C'de 30 dakika ısıyla inaktivasyon işlemi uygulanır (29, 45). Bazı araştırmacılar ısıyla inaktivasyon işlemi sonunda oosit üzerinde toksik etkili serbest radikallerin oluştuğu ve serum içeriğindeki bazı yararlı komponentlerin yok olduğunu bildirmektedir (6).

Maturasyon ve kültür aşamalarında serum kullanımı, bir çok riski de beraberinde getirmektedir. Serum gibi biyolojik ürünlerin kullanımıyla, viral kontaminasyonlar mümkün olmaktadır. İn vitro fertilizasyon gebeliklerinde, gebelik süresinin değişken olması, abort oranının yüksek olması ve normalden büyük fötüs gelişimi, oositin maturasyon ve kültür sürecinde serum kullanımına bağlanmaktadır. Sayılan bu olumsuzlukların önlenmesi amacıyla serumsuz kültür ortamları da geliştirilmiştir (23, 44).

3. Antioksidan Katkılar

İn vitro kültür ortamında oksijen bileşiminin yüksek olması, serbest oksijen

radikallerinin ve oksidatif ürünlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Oksijenin oositler üzerindeki bu olumsuz etkisini gidermek amacıyla antioksidan maddeler kültür ortamlarına katılmaktadır. β -merkapt etanol, tokoferoller ve bazı antioksidanlar bu amaçla kullanılmaktadır (14, 49).

4.Foliküler Sıvı Katkıları

Foliküler sıvı, folikül hücrelerinin metabolik aktiviteleri sonucu bir takım değişimlere uğramış; steroidleri, glikozaminoglikanları ve glikoproteinleri içeren, serum transudatıdır. Sığır foliküler sıvısı (Bovine Follicular Fluid-bFF) sığır oositlerinin in vitro maturasyon ortamına katıldığında nükleer ve sitoplazmik maturasyon oranını % 10-20 kadar artırdığı kaydedilmiştir (11).

5.Hücresel Katkılar

İn vitro kültür mediumuna hücresel katkı yapmak, hem ortamdaki serbest oksijen yoğunluğunun azaltılması hem de 8-16 hücre aşamasındaki embriyonun gelişiminin durmasını önlemek amacıyla yöneliktir. Bu amaçla farklı türlerin üreme organları dışındaki dokulardan elde edilen değişik hücre tipleri de kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan hücreler; granuloza, teka hücreleri, sığır oviduktu epitel hücreleridir (56). Folikül aspirasyonunun ardından, aspirasyon sıvısının santrifüj edilmesiyle granuloza hücreleri elde edilir ve ince bir tabaka halinde hormonsuz kültür ortamının tabanına 10^5 /ml medium olacak şekilde yayılır. Bu yöntem kaliteli blastosist eldesinde oldukça etkindir. Bazı araştırmacılar ise, granuloza hücrelerinin FCS ile birlikte katılmasının, maturasyon oranı üzerine daha etkili olduğunu kaydetmişlerdir (15, 21).

Granuloza hücrelerinin maturasyon ortamında kullanılması durumunda, bunların ürettikleri steroidlerin de katkısıyla oositler için en iyi gelişim ortamı oluşmaktadır (35). Bavister ve ark. (6), embriyo gelişimi

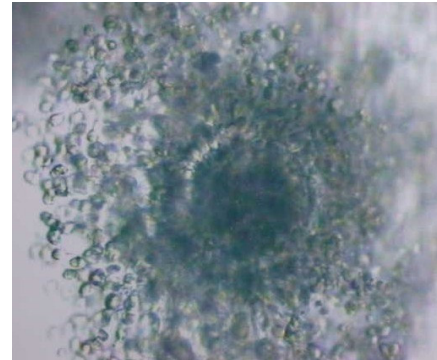
açısından, kültür ortamına somatik hücre katılmasının gereksiz olduğunu buna alternatif olarak, protein katılmaksızın, büyüme faktörleri, vitaminler, hormonlar ve enerji kaynaklarıyla desteklenmiş kültür ortamlarının kullanılmasının uygun olacağını bildirmiştir.

Maturasyon Ölçütleri

Maturasyon, kumulus hücrelerinin genişlemesi, oositin birinci metafaz safhasına girerek, germinal vezikülün yıkılmasını takiben, ilk polar cisimciğin çıkışı ve oositin metafaz 2 safhasına geçmesi olarak tanımlanır. Oositte maturasyonun değerlendirilmesi, kumulus hücre ekspansiyonuna ve ilk polar cisimciğin varlığına bakılarak yapılmaktadır (50) (Resim 1 ve 2).



Resim 1 : 1. Polar cisimciği atılmış oosit



Resim 2 : Kumulus ekspansiyonu

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. **Ağca Y, Rutledge JJ, Crister JK (1998)** *Developmental competence of immature and in vitro matured bovine oocytes after exposure to various osmolalities*. (Abstr.). *Theriogenology*, 49: 193.
3. **Al-Katanani YM, Paula FFL, Hansen PJ (2002)** *Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in holstein cows*. *J.Dairy Sci.* 85: 390-396.
4. **Ali A, Sirard MA (2002)** *Effects of the absence or presence of various protein supplement on further development of bovine oocytes during in vitro maturation*. *Biology of Reprod.* 66: 901-905.
5. **Bae LH, Foote RH (1980)** *Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality*. *J.Reprd. Fert.* 59: 11-13.
6. **Bavister BD, Rose TAH, Pinyopummintr T (1992)** *Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media*. *Theriogenology*. 37 (1): 127-146.
7. **Birler S, Pabuççuoğlu S, Alkan S, Evecen M, İleri İK (1997)** *Siğır oositlerinin in vitro fertilizasyonu üzerine farklı medyumların ve bu medyumlara yapılan hormon ilavelerinin etkileri*. *İst. Ü. Vet. Fak. Derg.* 23 (2): 511-516.
8. **Birler S, Pabuççuoğlu S, İleri İK, Aklan S, Evecen M (1998)** *Siğır oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında farklı sürelerin etkisi*. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 22: 551-557.
9. **Brackett BG, Younis AI, Fayrer RAH (1989)** *Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes mature in vitro with high concentrations of luteinizing hormone*. *Fertility and Sterility* 52 (2): 319-324.
10. **Brackett BG, Zuelke KA (1993)** *Analysis of factor involved in the in vitro production of bovine embryos*. *Theriogenology*, 39: 43-64
11. **Chauan MS, Palta P, Das SK, Katiyar PK, Madan ML (1997)** *Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: Effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro*. *Theriogenology*, 48: 461-469.
12. **Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR (1998)** *Mechanism of estrogen action: Lessons from the estrogen receptor-knockout mouse*. *Biology of Reprod.* 59: 470-475.
13. **Eyestone WH, Boer HA (1993)** *FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium*. (Abstr.). *Theriogenology*, 39: 216.
14. **Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, Nishimura K, Yamada M, Utsumi K (1997)** *Effects of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro- produced bovine embryos*. *J. Anim. Sci.* 75: 483-489.
15. **Fukui Y, Ono H (1989)** *Effects of sera, hormones and granulose cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes*. *J.Rerod. Fert.* 86: 501-506.
16. **Fukushima M, Fukui Y (1985)** *Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 9: 323-332.
17. **Galli C, Lazzari G (1996)** *Practical aspects of IVM/IVF in cattle*. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 371-379.
18. **Gardner DK (1998)** *Changes requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture*. *Theriogenology*, 49: 83-102.
19. **Gomez E, Diez C (2000)** *Effects of glukoz and protein sources on bovine embryo development in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 23-37.
20. **Gordon I (1994)** *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cab international Co., Wallingford UK.
21. **Goto K, Iritani A (1992)** *Oocyte maturation and fertilization*. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 407-413.
22. **Hagemann LJ (1999)** *Influence of the dominant follicle on the oocytes from subordinate follicles*. *Theriogenology*, 51: 449-459.
23. **Hoshi H (2003)**. *In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer*. *Theriogenology*, 59: 675-685.
24. **Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM (1998)** *Growth hormone promotes cytoplasmic maturation of in vitro matured oocytes*. (Abstr.) *Theriogenology*, 49(1): 312.
25. **Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N (1995)** *Manual of Bovine Embryo Transfer*. National Livestock Breeding Centre press JLTA, Shirakawa, Japan.
26. **Kojima T (1999)** *Embryo transfer (ET) in cattle-theory and practice-* National Livestock Breeding Centre press, Shirakawa, Japan.

27. **Kuzmina TI, Lebedeva IYu, Torner H, Alm H, Denisenko VYu (1999)** *Effects of prolactin on intracellular stored calcium in the course of bovine oocyte maturation in vitro.* Theriogenology, 51: 1363-1374.
28. **Liu JM, Jin ZQ, Zhao XX, Zhu YD (1991)** *The development of bovine follicular oocytes matured in different culture media.* Veterinary Research Communications 15: 257-260.
29. **Marquant BL, Humblot P (1998)** *Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine.* Theriogenology, 49: 3-11.
30. **Matsui M, Takahashi Y, Hishunuma M, Kanagawa H (1995)** *Effects of supplementation of the maturation media with insulin on in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes.* Jpn. J. Vet. Res. 43 (3-4): 145-153.
31. **Mayes M (2002)** *The meiotic arrest of bovine oocytes.* Département des sciences animales Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation Universitélaval Québec Doktora tezi. De l'Université Laval, Quebec-Canada.
32. **Mazur P, Schneider U (1986)** *Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications.* Cell Biophysics, 8: 259-284.
33. **Mac Callum C, Salamone D, Palazs AT (1997)** *Effect of maturation medium supplements on bovine oocytes fertilization and embryo development.* (Abstr.) Theriogenology, 47(1):193.
34. **Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y (1998)** *Aspects of follicular and oocyte maturation that effect embryonic developmental potential.* Institut National de la Recherche Agronomique Station de Physiologie de Reproduction des Mammifères Domestiques press. Nouzilly, France.
35. **Mingoti GZ, Garcia JM, Rosa-e-Silva AAM (1995)** *The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells.* Brazilian Journal of Medical and Biological Research 28: 213-217.
36. **Moor RM, Trounson AO (1977)** *Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity.* J. Reprod. Fert. 49: 101-109.
37. **Mori J (2001)** *Advances in farm animal embryo transfer hormone research,* JICA/ National Livestock Breeding Center press, Shirakawa, Japan.
38. **Nagai T (1999)** *In vitro fertilization in cattle and pigs.* Tohoku National Agricultural Experiment Station pres, Iwate, Japan.
39. **Nagai T (2001)** *The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes.* Theriogenology, 55: 1291-1301.
40. **Nakada K, Moriyoshi M, Nakao T, Watanabe G, Taya K (2000)** *Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle – stimulin hormone, luteinizing hormone, estradiol-17 β , testosterone, progesterone, and inhibin in heifers from birth to puberty.* Domestic Anim. Endocrinology, 18: 57-69.
41. **Nakagawa A, Leibo SP (1997)** *Influence of luteinizing hormone on nuclear maturation of bovine oocytes in vitro.* (Abstr.) Theriogenology, 47(1): 198.
42. **Ocana JMQ, Pinedo MM, Moreno MM (1999a)** *Influence of follicle size, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured in vitro.* Theriogenology, 51: 667-672.
43. **Ocana JMQ, Pinedo MM, Moreno MM (1999b)** *The effect of different sera and bovine serum albumen fraction (BSA) on in vitro maturation of immature bovine oocytes.* Arc. Zootec. 48: 167-174.
44. **Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL (1991)** *In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium.* Biol. Reprod. 44: 256-260.
45. **Sanbuissho A, Threlfall WR (1989)** *The effects of estrus cow serum on the in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte.* Theriogenology, 31(3): 693-699.
46. **Schellander K, Fuhrer F, Brackett BG, Korb H, Schleger W (1990)** *In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplement with estrous cow serum.* Theriogenology, 33(2): 477-485.
47. **Shioya Y (1993)** *Calf production by in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro.* JARQ 26 (4): 287-293.
48. **Sirard MA, Blondin P (1996)** *Oocyte maturation and IVF in cattle.* Anim. Reprod. Sci. 42: 417-426.
49. **Steele CE, Jeffery EH, Diplock AT (1974)** *The effect of vitamin E and syntetic antioxidants on the growth in vitro of explantet rat embryos.* J. Reprod. Fert. 38: 115-123.
50. **Süss U, Stranzinger G (1987)** *Characterisation of in vitro matured and fertilized bovine oocytes.* Symposium on Biotechnology

- in Animal Breeding 11-14 November. Technical University of Berlin, Germany.
51. **Takashi M (1998)** *In vitro growth and development of bovine oocytes*. Symposium on molecular bioengineering of food animals. 23-24 October, Tokyo, Japan.
 52. **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.
 53. **Tekeli T (1992)** *In vitro dölllenmiş fare ovumlarının gelişmesi üzerine EDTA'nın etkisi*. S.Ü. Vet. Fak. Derg. 8(1): 25-27.
 54. **Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA (1972)** *Successful culture in vitro of sheep and cattle ova*. J. Reprod. Fert. 30:493-497.
 55. **Varisanga MD, Sumantri C, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T (1998)** *Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF produced bovine embryos*. Theriogenology, 50: 1015-1023.
 56. **Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH, Schultz GA (1991)** *Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos*. Molecular Reprod. Develop. 30: 330-338.
 57. **Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA (1989)** *Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro*. Gamete Research, 23: 189-201.
 58. **Zuelke KA, Brackett BG (1990)** *Luteinizing hormone –enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation*. Biology of Reproduction, 43: 784-787.
 59. **Zuelke KA, Brackett BG (1993)** *Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone*. Biology of Reproduction, 48: 815-820.