

FARE OVUMLARININ İN VİTRO FERTİLİZASYONU ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro

Tevfik TEKELİ¹, Mehmet GÜLER², Melih AKSOY³

Summary : The aim of this study was to test the recommended techniques of in vitro fertilization in mice as an experimental animal.

Adult female mice of Swiss albino strain were superovulated by intraperitoneal injection of PMSG and HCG 48 hours apart. They were killed 16 hours after injection of HCG and their eggs were recovered under warm oil in a plastic dish containing 0.4 ml of incubation medium.

Sperms recovered from cauda epididymis of adult males of the same strain were suspended in a medium and incubated at 37° C under % 5 CO₂ in air for 1.5-2 hours before they were used for insemination. The incubation medium was THY medium containing glucose, sodium pyruvate, bovine albumin and antibiotics.

At the time of insemination, a drop of sperm suspension (10-20 µl) was added to the medium containing egg clot. Eggs and sperms were incubated in incubation medium for 6 hours. In the first group, fertilized eggs were left into the same medium. In the second group they were transferred to the development medium (Modified Whitten's) without sodium lactate and incubated until they were examined under stereo-microscope.

As a conclusion, in this study fertilized eggs and 2-cell stage embryos were obtained but further stage of embryos (morulae, blastocyst) couldn't be reached.

Özet : Bu çalışmada deney hayvanı olarak kullanılan farelerde in vitro fertilizasyon için önerilen yöntemlerin denenmesi ve in vitro yolla fertilizasyon olgusunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada ovum elde etmek amacıyla seksüel olgunluğa ulaşmış İsviçre albinosu dişi farelere 48 saat ara ile önce PMSG daha sonra HCG hormonu enjekte edilerek süperovulasyon oluşturuldu.

Ovumlar, HCG enjeksiyonundan 16 saat sonra fareler öldürülerek cumulus oophorus hücreleri ile birlikte elde edildi ve sıvı paratın ile kaplanmış, ortasında 0.4 ml vasat bulunan petri kabındaki vasat içerisine kondu.

Spermatozoitler ise İsviçre albinosu olgun erkek farelerin cauda epididimislerinden alındı ve 37°C'deki % 5 CO₂'li etüvde 1.5-2 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon vasatı olarak glukoz, sodyum piruvat, siğir serum albumini ve antibiyotikleri ihtiva eden THY vasatı kullanıldı.

Daha sonra önceden hazırlanmış bulunan spermatozoit süspansiyonundan 10-20 µl bir pipet yardımıyla alınarak ovumların bulunduğu petri kabına ilave edildi ve 6 saat süreyle birarada inkübasyona bırakıldılar. Bunu takiben ilk deneme grubundaki fertilize ovumlar aynı vasat içerisinde bırakılmalarına karşın ikinci deneme grubundaki fertilize ovumlar gelişme vasatı olan, ancak sodyum laktat içermeyen Modifiye Whitten's vasatına nakledildi ve 37°C'deki % 5 CO₂'li etüvde inkübasyonu takiben mikroskop altında kontrol edildiler.

Sonuç olarak Ovum ve spermatozoitlerin birarada inkübasyonları sonucu ovumların fertilizasyonları sağlanmış ancak daha ileri bölünme aşamalarına kadar geliştirilememiştir.

Giriş

Memelilerde döllenmeyi etkileyen bazı sorunların ortaya konmasından sonra, döl alınabilmesi ve gebelik oranlarının yükseltilebilmesi için in vitro fertilizasyon çalışmalarında gözle görülür gelişmeler sağlanmıştır. Çiftlik hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda başarı oranı düşük olmasına rağmen insan ve küçük deney hayvanlarında başarılı sonuçlar elde edilmiştir (6).

Bu konudaki ilk çalışma 1878 yılında tavşan ve kobaylarda yapılmış, bundan tam yüz yıl sonra 1978 yılında bu yöntemle insanlarda ilk gebelik ve doğum olayı gerçekleştirilmiştir (5, 11, 15).

Farelerde in vitro fertilizasyon çalışmalarında ovum vericisi olarak kullanılan dişilere aydınlık ve karanlık periyot uygulamalarını takiben PMSG ve HCG hormonlarının enjeksiyonuyla süperovulasyon sağlanabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (1, 2, 7, 8, 9, 14).

Ovumların fertilizasyonu amacıyla kullanılacak spermatozoitler ise erkek farelerin cauda epididimisinden elde edilebilmektedir (7, 8, 9, 12, 13, 14). Spermatozoitlerin kapasitasyonu için çeşitli vasatlar önerilmiştir (3, 9, 10, 12, 13). Kapasitasyon süresi ise ortalama 1-3 saat olarak bildirilmektedir (3, 9, 14).

Kapasitasyonları sağlanmış fare spermatozoitlerinin ovumlarla birlikte 5-7 saat süreyle 37°C'de ve % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilmesi sonucu fertilize olmuş ovumlar elde edilebilmektedir (7, 8, 9).

Bu çalışmada, farelerde in vitro fertilizasyon için önerilen bazı yöntem ve tekniklerin denenmesi ve in vitro olarak fertilizasyon olgusunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

1 Doç. Dr., S.Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Bilim Dalı

2 Yrd. Doç. Dr., S.Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Bilim Dalı

3 Arş. Gör., S.Ü. Veteriner Fakültesi, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı

Materyal ve Metot

Bu çalışmada İsviçre albinosu beyaz dişi ve erkek fareler kullanıldı. Dişi materyal seksüel olgunluğa ulaşmış en az 6 haftalık, erkek materyal ise fertilitesi önceden saptanmış fareler arasından seçildi. Dişi ve erkek fareler çalışma süresince özel hazırlanmış odada, ayrı ayrı kafeslerde barındırıldı. Normal bakım ve beslenme şartları altındaki farelere 10 saat karanlık ve bunu takiben 14 saat aydınlık ışık periyodu uygulandı.

Oyum elde etmek için kullanılacak dişi farelere süperovulasyon oluşturmak amacıyla 48 saat arayla önce 7.5 IU PMSG sonra 7.5 IU HCG hormonu enjekte edildi. Ovumlar son HCG enjeksiyonundan 16 saat sonra stereo-mikroskop altında oviductun ampulla kısmının delinmesiyle dışarıya alındı. Elde edilen ovumlar, pH'sı % 5'lik CO₂ ile dengelenmiş ve sıvı parafin ile kaplanmış 0.4 ml THY (13) vasatı içerisine aktarıldı.

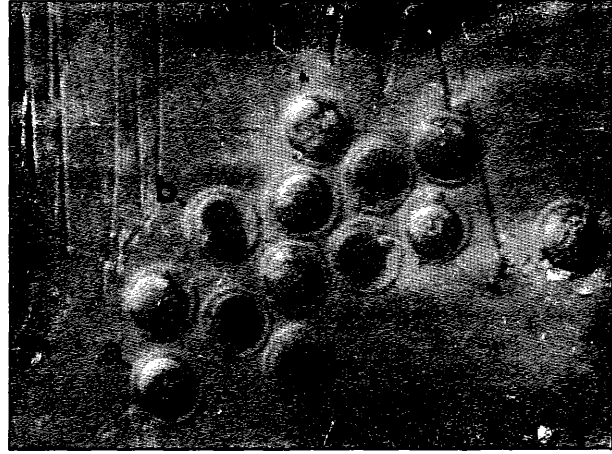
Spermatozoitlerin elde edilmesi için erkek farelere laparotomi yapılarak cauda epididimis dışarıya alındı ve 0.4 ml THY vasatı içerisinde bir makas yardımıyla parçalanarak spermatozoitlerin vasat içinde yayılmaları sağlandı. Vasat içindeki spermatozoitlerin kapasite olmaları için 1.5-2 saat süreyle 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, spermatozoit süspansiyonundan 10-20 µl alınarak ovumların bulunduğu vasat içerisine ilave edildi ve fertilizasyonun sağlanması için tekrar 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

Çalışmadaki ilk deneme grubunda ovum ve spermatozoitlerin 6 saat süreyle birlikte inkübasyonlarını takiben fertilize ovumların gelişme vasatına nakilleri yapılmadı. Aynı vasat içerisinde daha uzun süre inkübasyonları sağlanarak ovumların gelişmeleri izlenmeye çalışıldı. Daha sonraki deneme grubunda ise ilk 6 saatlik inkübasyondan sonra fertilize ovumlar gelişme vasatı olarak bilinen ancak sodyum laktat içermeyen Modifiye Whitten's vasatına nakledildi ve bu vasat içerisinde 37°C'de, % 5 CO₂'li etüvde 24 saat süreyle inkübe edildiler. Inkübasyon süresinin bitiminde ovumlar mikroskop altında incelenerek daha ileriki embriyonik aşamalara ait değişikliklerin bulunup bulunmadıkları kontrol edildi.

Bulgular

Çalışmada ilk deneme grubunda 6 saatlik inkübasyondan sonra mikroskopta yapılan kontrollerde ovumların fertilize oldukları gözlemlendi. Fertilizasyonun kanıtı olarak ikinci kutup cisimciği, dişi ve erkek pronukleuslar ve iki hücreli safhada bulunan embriolar tesbit edildi (Resim 1). Aynı vasat içerisinde daha uzun süre inkübasyona devam edildiğinde ise ilk kontrollerinde ikinci kutup cisimciği bulunan, dişi ve erkek pronukleusları taşıyan embrioların daha ileri aşamalara ulaşamadıkları, 2-hücreli aşamada bulunan embrioların da daha ileri dönemlere geçemiyerek canlılıklarını tamamen kaybettikleri belirlendi.

Çalışmanın daha sonraki deneme grubunda ise ovumların, fertilizasyon vasatında, CO₂'li etüvde, 37°C'de inkübasyonlarını takiben bir kısmının fertilizasyon kriterlerini gösterdikleri ve fertilize oldukları tespit edildi. Ancak ovumların 6



Resim 1 : Fertilizasyon vasatı içerisinde ilk 6 saatlik inkübasyonu izleyen dönemdeki embrio ve ovumlar, a. Dişi ve erkek pronukleusları içeren ovum b. İki hücreli dönemdeki embrio.

saatlik inkübasyonu takiben gelişme vasatına nakledilmelerinden sonra yapılan ilk kontrollerde daha ileri aşamalara ulaşamadıkları ve canlılıklarını kaybettikleri gözlemlendi.

Tartışma ve Sonuç

Sunulan çalışmada süperovulasyonun oluşturulmasında ve ovumların elde edilmesinde araştırmacılar (1, 7, 9, 14) tarafından önerilen yöntemler denenmiş, süperovulasyon cevabının yeterli olduğu tespit edilmiş, oviductun diseksiyonu ve ovumların elde edilmesinde herhangi bir güçlük karşılaşılmamıştır.

Farelerle ilgili in vitro fertilizasyon çalışmalarında ovumların fertilizasyonu amacıyla genellikle cauda epididimisten elde edilen spermatozoitlerin kullanıldığı bildirilmektedir (7, 8, 9, 12, 13, 14). Bu çalışma sırasında da kullanılan spermatozoitlerin cauda epididimisten elde edilmelerinde herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır.

Spermatozoitlerin kapasitasyonu için THY vasatı kullanılmış, spermatozoitler bu vasat içerisinde 2 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Her iki çalışma grubunda da fertilize olmuş ovumların ve 2-hücreli embrioların elde edilmiş olması, bu vasatın spermatozoitlerin kapasitasyonu için uygun olduğunu ve bu işlevi yerine getirdiğini göstermektedir.

Fertilize olmuş ovumlar ve embriolar gelişmelerini sürdürebilmeleri için ilk 6 saatlik inkübasyon süresini takiben gelişme vasatına aktarılmaktadırlar (1, 3, 4). Miyamoto ve Chang (7), epididimal spermatozoitlerle döledikleri ovumları gelişme vasatına aktarmadan aynı vasat içerisinde inkübe ettiklerinde embrioların % 10'unun blastosist safhasına kadar geliştiklerini bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmanın ilk deneme grubunda 2-hücreli embriolar ve fertilizasyon bulgularına sahip diğer ovumlar gelişme vasatına aktarılmadan aynı fertilizasyon vasatı içerisinde uzun süreli olarak inkübe edilmişler ve yapılan kontrollerde embrioların beklendiği gibi daha ileri aşamalara ulaşamadıkları, gelişmelerini durdurdukları ve canlı-

liklerini kaybettiği gözlenmiştir. Bu durumun embrioların gelişme vasatına aktarılmamasına, vasat pH'sında sonradan şekillenebilecek değişmelere veya bakteriyel kontaminasyona bağlı olabileceği düşünülebilir.

Sonraki deneme grubunda fertilizasyon vasatında dölenen ve 2-hücreli aşamaya ulaşan ovumlar sodyum laktat içermeyen modifiye Whitten's vasatına nakledildiler ve uzun süre bu vasat içinde inkübe edildiler. Yapılan mikroskopik kontrollerde embrioların yine ileri aşamalara gelişemedikleri ve canlılıklarını kaybettiği gözlemlendi. Bunun nedeni olarak vasata sodyum laktatın ek-

lenmemesi, uygun olmayan inkübasyon koşulları veya vasata ait olabilecek diğer olumsuz faktörler düşünülebilir.

Sonuç olarak çalışmada kullanılan in vitro fertilizasyon tekniğiyle deney hayvanlarında başarılı sonuçların elde edilebileceği ortaya konmuştur. Ancak ovumların fertilizasyonundan itibaren blastosistlerin şekillenme aşamasına kadar olan dönemin büyük bir özen ve dikkat gerektirdiği, olumsuz laboratuvar koşulları altında embrioları ileri aşamalara kadar geliştirmenin güç olacağı kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Abramczuk, J., Solter, D and Koprowski, H. (1977). The beneficial effect of EDTA on development of mouse one cell-embryos in chemically defined medium. *Develop. Biol.*, 61, 378-383.
2. Hogan, B., Constantini, F and Lacy, E. (1986). "Manipulating The Mouse Embryo". Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A.
3. Hoppe, P.C. and Pitts, S. (1973). Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol. Reprod.*, 8, 420-426.
4. Hoshi, M. and Toyoda, Y. (1985). Effect of EDTA on the preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 56, 931-937.
5. Hunter, R.H.F. (1980). "Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals". Academic Press, London.
6. Kanagawa, H., Abas-Mazni, O. and Valdez, C.A. (1986). Oocyte maturation and in vitro fertilization. *FAO, AGA : BIOT 86/13*, October.
7. Miyamoto, H. and Chang, M.C. (1972). Development of mouse eggs fertilized in vitro by epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 30, 135-137.
8. Miyamoto, H. and Chang, M.C. (1973). Effect of osmolality of mouse and golden hamster eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 33, 481-487.
9. Miyamoto, H. and Chang, M.C. (1973). The importance of serum albumin and metabolic intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 32, 193-205.
10. Pavlok, A. and McLaren, A. (1972). The role of cumulus cells and the zona pellucida in fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 29, 91-97.
11. Renou, P., Trounson, A. O., Wood, C. and Leeton, J.F. (1981). Human oocytes for in vitro fertilization. An instrument for maximizing oocyte recovery rate. *Fertil. Steril.*, 35, 409.
12. Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hosi, T. (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *J. Animal Reprod.*, 16, 147-151.
13. Toyoda, Y., Yokoyama, and Hosi, T. (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro II. Effects of in vitro pre-incubation of spermatozoa on time of sperm penetration of mouse eggs in vitro. *Jap. J. Animal Reprod.*, 16, 152-157.
14. Tsonuda, Y. and Chang, W.C. (1975). Penetration of mouse eggs in vitro: Optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 44, 139-142.
15. Wood, C. (1981). The beginning of life. *Med. J. Aust.*, 1, 305.