



PROTEİN İÇERMİYEN MEDYA İLE OLGUNLAŞTIRILAN İMMATÜR SIĞIR OOSİTLERİNİN *IN VİTRO* FERTİLİZASYONU VE BLASTOSİSTE KADAR GELİŞİMLERİ

Yusuf Ziya GÜZEY^{1*}

¹Mustafa Kemal University, Agricultural Faculty, Department of Animal Sciece, 31060, Hatay, Türkiye

Özet: Henüz doğmamış buzağılardan elde edilen fetal buzağı serumu, buzağının acı çekmesine neden olmaktadır. Hayvanlara daha az acı çektilmesi ve hayvan refahı gibi konularda süregelen tartışmalar neticesinde özellikle son yıllarda, *in vitro* embriyo ve hücre kültüründe fetal serum ikamelerinin kullanıma olanaklarına dair çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Bununla birlikte serum içerisinde mevcut olan ve konsatrasyonu tam olarak belirlenemeyen moleküllerin hücrel işlevler üzerine etkilerinden dolayı özellikle tekli moleküler yolların araştırıldığı çalışmalarda serum kullanımı bazı çakışmalara neden olabilmektedir. Bu amaçla, serum ikamelerinin kullanım olanaklarının araştırıldığı bu çalışmada, *in vitro* matürasyon için knockout serum™ kullanımının ilk bölünme ve blastosiste kadar gelişen embriyo sayısının önemli oranda artırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte sentetik serum ikamesi ve serum ikamesi 2 kullanımının ise elde edilen embriyo sayılarını bir miktar düşürdüğü belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: IVF, Serum ikamesi, Sığır, Olgunlaştırma, Blastosist, Oosit


In Vitro Fertilization of Immature Bovine Oocytes Matured In a Protein-Free Media and Their Subsequent Development to the Blastocysts

Abstract: Fetal calf serum obtained from unborn calves causes pain to the calf. As a result of the ongoing discussions on issues such as less suffering to animals and animal welfare, especially in recent years, there has been a lot of research on the possibilities of using fetal serum substitutes in *in vitro* embryo and cell culture. However, the use of serum may cause some conflicts, especially in studies investigating single molecular pathways, due to the effects of molecules present in serum and whose concentration cannot be determined precisely on cellular functions. For this purpose, in this study, in which the possibilities of using serum substitutes were investigated, it was determined that the use of knockout serum™ for *in vitro* maturation significantly increased the number of embryos developing until the first division and blastocyst. On the other hand, it was determined that the use of synthetic serum substitution and serum substitution 2 slightly reduced the number of embryos obtained.

Keywords: IVF, Serum replacement, Bovine, Maturation, Blastocyst, Oocyte

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Mustafa Kemal University, Agricultural Faculty, Department of Animal Sciece, 31060, Hatay, Türkiye

E mail: yzguzey@gmail.com (Y. Z. GÜZEY)

Yusuf Ziya GÜZEY  <https://orcid.org/0000-0002-4900-6038>

Gönderi: 11 Haziran 2023

Kabul: 16 Temmuz 2023

Yayınlanma: 15 Ekim 2023

Received: June 11, 2023

Accepted: July 16, 2023

Published: October 15, 2023

Cite as: Güzey YZ. 2023. *In vitro* fertilization of immature bovine oocytes matured in a protein-free media and their subsequent development to the blastocysts. BSJ Eng Sci, 6(4): 321-324.

1. Giriş

Özellikle verim yönünde yapılan iyileştirmeler sonucunda buzağılama oranı düvelerde %55-60, sağmal ineklerde ise %35-40 seviyelerine kadar düşmüştür. Bu noktada, sürü seviyesinde, üretim ve üreme özellikleri arasındaki negatif genetik korelasyonlar etkilidir (Lonergan ve ark. 2016).

Hayvansal kaynaklı protein içermeyen medyaların *in vitro* fertilizasyonda (IVF) kullanımı hipoalerjenik bileşenleri bulundurmaması, içeriği tam tanımlanabilir olduğundan embriyo gelişimi üzerinde daha iyi kontrol sağlanması, alıcı ile verici arasındaki immünolojik uyumluluk ve serum kaynaklı enfeksiyon risklerinin azaltılması gibi pek çok noktada avantaj sağlamaktadır. Sığır embriyolarının *in vitro* üretim koşullarının iyileştirilmesi ve daha detaylı tanımlanması üzerine,

özellikle son 20 yıllık süreç içerisinde birçok çalışma yapılmıştır. Serum içerisinde mevcut olan ve konsatrasyonu tam olarak belirlenemeyen moleküllerin hücrel işlevler üzerine etkilerinden dolayı özellikle tekli moleküler yolların araştırıldığı çalışmalarda serum kullanımı bazı çakışmalara neden olabilmektedir. Her ne kadar serumun oosit matürasyonu ve *in vitro* embriyo üzerine olumlu etkileri birçok araştırma sonucu ile ortaya konmuş olsa da bazı çekincelerin bulunması araştırmacıları ticari embriyo üretiminde hayvansal kaynaklı olmayan alternatif çözümlere yöneltmektedir (Grad ve ark., 2010; Korhonen ve ark., 2010; Çevik ve ark., 2014).

Protein içermeyen medya ile yapılan kültürde kümülüs-oosit kompleksi (KOK) ve oositler, plastik/cam malzemeye yapışabilmekte ve müdahale güçleşmektedir. Bununla birlikte serum, hormonlar, büyüme faktörleri,



vitaminler, peptitler gibi bir seri molekül içerebilmekte ve bu nedenle de serum kaynakları arasında biyolojik aktivite bakımından önemli farklılıklar olabilmektedir (Çevik ve ark., 2011). Ayrıca, hayvan kaynaklı serumlar özellikle viral ve prion kaynaklı enfeksiyonlar için potansiyel kaynaklardır (Chanson ve ark., 2001).

Mevcut serum kaynaklarının gerek hayvanlara eziyet alanındaki endişeleri ve gerekse de muhtemel kontaminasyon risklerinin elimine edilmesi bakımından serum ikameleri son yıllarda tercih edilen bir alternatif oluşturmaktadır. Yapılan bu çalışma ile IVF laboratuvarlarının çalışma protokollerinin günümüz teknolojileri doğrultusunda güncellenmesi ve böylece *in vitro* embriyo üretimindeki başarı oranının artırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Embriyo Kültürü laboratuvarında yürütülmüştür. Kullanılan stok solüsyonlar Caisson Labs (Sugar City, ID, USA) isimli firmadan satın alınmıştır. Araştırma materyalini, Antakya'da özel bir kesimhanede kesilen sığırlardan alınan ovaryumlardan elde edilen KOK ve oositler oluşturmuştur. Bu amaçla uygun taşıma koşullarında laboratuvara getirilen ovaryumlar üzerindeki 2-6 mm çaplı yüzeysel foliküllerden, iğne takılı enjektör yardımı ile KOK içeren folikül sıvısı alınarak 15 mL tüp içerisinde toplanmıştır. Folikül sıvısının içerdiği KOK'lar stereo mikroskop yardımı ile 10× büyütmede bulunarak morfolojik değerlendirme sonucunda düzgün bir sitoplazma ve zona pellucida yapısına sahip, atretik olmayan ve çevresinde yeterince kümülüs hücresi bulunan oositler matürasyon için seçilmişlerdir. Seçilen oositler deneme gruplarına ayrılarak 38 °C' de, havada %5 CO₂ ve maksimum nem koşulları altında matürasyon için kültüre alınmıştır. Deneme gruplarına göre tasarlanan matürasyon medyalarının kompozisyonu aşağıdaki şekildedir.

MatC= TCM 199 + pirüvat (22µg/ml) + FSH (5 µg/ml) + LH (1 µg/ml) + E₂ (4 ng/mL) + 50 IU Penisilin + 50 mg Streptomisin + %10 fetal buzağı serumu (FBS)

MatSR2= TCM 199 + pirüvat (22µg/ml) + FSH (5 µg/ml) + LH (1 µg/ml) + E₂ (4 ng/mL) + 50 IU Penisilin + 50 mg Streptomisin + %10 Serum Replacement 2 (SR2)

MatKSr= TCM 199 + pirüvat (22µg/ml) + FSH (5 µg/ml) + LH (1 µg/ml) + E₂ (4 ng/mL) + 50 IU Penisilin + 50 mg Streptomisin + %10 Knock-out Serum (KSr)

MatSSS= TCM 199 + pirüvat (22µg/ml) + FSH (5 µg/ml)

+ LH (1 µg/ml) + E₂ (4 ng/mL) + 50 IU Penisilin + 50 mg Streptomisin + %10 Serum Substitute Supplement (SSS) Matürasyon medyalarında deneme grupları için kullanılan SR2, Sigma-Aldrich (S9388); KSr, ThermoFisher Sci (10828010); SSS ise Irvine Sci (99193) isimli firmalardan satın alınmıştır.

Matürasyon işlemi inkübatör içerisinde yaklaşık olarak 22 saat süresince devam etmiş, bu süre sonunda fertilizasyon medyalarına alınan oositlerde *in vitro* fertilizasyonun sağlanması amacıyla 1×10⁶ sperm/mL konsantrasyonunda spermatozoa ile 8-10 saat süre ile kültüre alınmıştır. Gametlerin *in vitro* fertilizasyonu amacıyla kullanılacak IVF-TALP (IVF-TL, 22 µg/mL pirüvat, 100 U/mL Penisilin, 100 µg/mL Streptomisin, 1 µg/mL, 20 µmol/L penicillamine, 10 µmol/L hypotaurine, 1 µmol/L epinephrine, 6 mg/mL BSA-FAF) ve SP-TALP (SP-TL, 22 µg/mL pirüvat, 100 U/mL Penisilin, 100 µg/mL Streptomisin, 6 mg/mL BSA-FracV) medya kullanılmıştır. Tüm medya geçişlerinde ise HEPEs-TALP (Hepes-TL, 22 µg/mL pirüvat + 100 U/mL Penisilin + 100 µg/mL Streptomisin +3 mg/mL BSA-FracV) tampon solüsyon kullanılmıştır.

Fertilizasyonun sağlanması amacıyla gametler 38°C' de, havada %5 CO₂ ve maksimum nem koşulları altında inkübatör içerisinde bekletilmiştir. Ardından mefruz zigotları çevreleyen kümülüs hücreleri vorteks yardımı ile uzaklaştırılmış ve 8'inci güne kadar potasyum simpleks medya içerisinde ve 38°C, %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ gaz kompozisyonu ve maksimum nem koşullarında inkübatör içerisinde kültüre alınmıştır. Embriyoların içerisinde bulunduğu medya 48 saat aralıkla tazelenmiş ve embriyo gelişimleri izlenerek kaydedilmiştir. Embriyoların kültürü için KSOM-BE (KSOM+AA, 3 mg/mL BSA-FAF, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL Streptomisin) medya kullanılmıştır.

Embriyonik gelişimin değerlendirilmesi amacıyla klevaj ve blastosist aşamasına kadar gelişen embriyo oranları kayıt altına alınmıştır. Bu amaçla kullanılan formüller şu şekildedir;

Klevaj oranı: ikiye bölünen zigot / toplam oosit sayısı

Blastosist oranı: blastosiste kadar gelişen embriyo / ikiye bölünen zigot sayısı.

3. Bulgular ve Tartışma

Araştırma 16 tekerrürlü olarak 4 grup üzerinde yürütülmüştür. Çalışma süresince toplam 1279 adet KOK kullanılmıştır.

Tablo 1. Gelişim aşamalarına göre farklı muamele gruplarının gelişim oranları

	Kontrol (n=321)	SR2 (n=319)	KSR (n=319)	SSS (n=320)	P
2 hücre	84,7±0,31 ^{ab} (272)	81,5±0,39 ^{bc} (260)	86,5±1,52 ^a (276)	80,0±0,38 ^c (256)	0.000
Blastosist	32,7±0,39 ^b (89)	29,6±0,46 ^c (77)	37,0±0,42 ^a (102)	28,5±0,41 ^c (73)	0.000

Değerler %±ortalamanın standard hatası (n) şeklinde verilmiştir.

Araştırma sonucunda matürasyon medyasına eklenen serum ikamelerinin klevaj oranları üzerine etkisinin önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0,000$). Yapılan Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi sonucuna göre in vitro kültüre alınan embriyolarda en yüksek ilk bölünme oranı Knockout Serum™ (KSR) verilen grupta elde edilmiş, kontrol grubu arasındaki farklılık ise istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($P>0,05$). Bununla birlikte Serum İkamesi 2 (SR2) ve Sentetik Serum İkamesi (SSS) verilen gruplarda gözlenen ilk bölünme oranları, Knockout Serum grubuna oranla anlamlı miktarda azalmıştır ($P<0,01$). En düşük ilk bölünme oranları ise %80 ortalama ile sentetik serum ikamesi verilen grupta gözlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada medya içerisine serum yerine serum ikamelerinin ilavesi ilk bölünme oranlarının önemli ölçüde artmasına neden olmuştur. İmmatür KOK'ların olgunlaştırılması, blastosiste kadar in vitro embriyo gelişimini etkileyen en kritik aşamaların başında gelmektedir. Oositlerin olgunlaştırılması için kullanılan medyum, sığır embriyolarının gelişimini önemli ölçüde etkilemektedir. İn vitro olgunlaştırma medyalarında sıklıkla kullanılan protein kaynakları serum ve sığır serum albümini (BSA) olarak karşımıza çıkmaktadır (Jin ve ark., 2017; Mingoti ve ark., 2011; Şen ve Kuran, 2018). Serum ilavesi bifazik bir etkiye sahiptir ve embriyo gelişimini erken aşamada inhibe eder, ancak daha sonraki aşamalarda ise destekler (Ali ve Sirard, 2002; George ve ark., 2008; Sağırkaya ve Üstüner, 2010; Sakurai ve ark., 2015). Elde etmiş olduğumuz bulgular, mevcut araştırma sonuçlarının bulguları ile de desteklenmektedir.

Blastosiste kadar gelişen embriyo oranları üzerinden yapılan karşılaştırmada, ilk bölünme oranlarına benzer biçimde, en iyi sonuçlar yine Knockout Serum grubunda elde edilmiştir. Bu gruptaki blastosiste kadar gelişen hücrelerin oranı diğer gruplara oranla önemli oranda artış göstermiştir ($P<0,01$). Bu grubu takiben kontrol grubundaki blastosist oranları diğer iki grup olan sentetik serum ikamesi ve serum ikamesi 2 gruplarına oranla anlamlı biçimde yüksektir ($P<0,001$).

KSR esas olarak özelleşmemiş embriyonik kök hücrelerinin kültürü amacıyla bir serum ikamesi olarak geliştirilmiş olup, pluripoten kök hücrelerinin kültüründe yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bununla birlikte SSS, insan albumini ve globulini içeren bir serum ikamesidir ve genel olarak insanlarda yardımcı üreme tekniklerinde kullanılmaktadır. Oositlerin in vitro olgunlaştırılması sonucu elde edilen döllerde canlılık, fötal buzağı serumu içerisindeki serum ve fetuin ile ilişkilidir. Diğer yandan, serum içermeyen ortamda BSA ile yapılan in vitro olgunlaştırma ve fertilizasyonda zona sertleşmesine bağlı olarak başarı azalmaktadır (Motohashi ve ark., 2017).

Her ne kadar serum embriyo kültür ortamına katkı yapsa da, medyadan çıkarılması durumunda belirli moleküllerin embriyo kültüründeki rolü daha iyi analiz edilebilir (Duquew ve ark., 2003). Kültür medyası içerisinde protein bulunmaması durumunda KOK ve oositlerin manipülasyonu zorlaşmakta, plastik ve cam

malzemeye yapışmalarına neden olmaktadır. Bununla birlikte serum hormon, vitamin, peptit ve protein gibi kısmen tanımlanmamış moleküller içerebilmektedir. Hayvan kaynaklı serumlar aynı zamanda viral ve prion kaynaklı enfeksiyonlara da neden olabilmektedir (Bavister ve ark., 1992; Brackett ve Zuelke, 1993; Chanson ve ark., 2001; Smetanina ve ark., 2006; Park ve ark., 2013).

Yapılan bu çalışma FBS kaynaklı protein ve fetuin olmadan da in vitro embriyo üretimi sonucunda sığırlarda canlı döllere elde edilebileceğini göstermiş fakat implantasyon öncesi gelişim potansiyelini destekleyen etkili bileşenlerin bir tanımlaması yapılamamıştır. Bununla birlikte implantasyon sonrası etkileri gösteren bir bulgu da elde edilmediğinden, daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

4. Sonuç

Mevcut araştırma sonuçları, in vitro fertilizasyon ve embriyo üretiminde fötal serum yerine serum ikamelerinin güvenle kullanılabilirliğini göstermiştir. Yapılan bu çalışmaya göre özellikle Knockout Serum™ sığır embriyolarının in vitro üretiminde güvenle kullanılabilir tanımlanmış kültür medyası olabileceği belirlenmiştir. Sığır oositlerinin in vitro matürasyonu aşamasında, medya içerisine serum yerine eklenen Knockout serum, oosit gelişiminin tamamlanması açısından %10 fötal seruma benzer ve hatta daha iyi sonuçlar elde edilmesine katkı yapabilmektedir. Bu sonuçların elbette ki daha detaylı araştırmalarla desteklenmesi de gerekmektedir. Lipid metabolizması, enerji tüketimi gibi detaylı çalışmalar yapılarak bu mekanizmanın ortaya çıkmasına neden olan faktörlerin belirlenmesi yerinde olacaktır. Bununla birlikte mevcut sonuçlar göz önüne alınarak serum ikamesinin sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırmasında güvenle kullanılabilirliği söylenebilir.

Katkı Oranı Beyanı

Yazarın katkı yüzdesi aşağıda verilmiştir. Yazar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	Y.Z.G.
K	100
T	100
Y	100
VTI	100
VAY	100
KT	100
YZ	100
KI	100
GR	100
PY	100

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, VTI= veri toplama ve/veya işleme, VAY= veri analizi ve/veya yorumlama, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon, PY= proje yönetimi, FA= fon alımı.

Çatışma Beyanı

Yazar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

Etik Onay Beyanı

Bu araştırmada hayvanlar ve insanlar üzerinde herhangi bir çalışma yapılmadığı için etik kurul onayı alınmamıştır.

Destek ve Teşekkür Beyanı

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (No. 18.M.042) desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Ali A, Sirard MA. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod*, 66(4): 901-905. DOI: 10.1095/biolreprod66.4.901.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA, 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. DOI: 10.1016/0093-691X(92)90251-L.
- Brackett BG, Zuelke KA. 1993. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39(1): 43-64.
- Chanson A, Nocera D, Senn A, De Grandi P, Germond M. 2001. Development of a well-defined medium for the in vitro maturation of immature bovine cumulus-oocyte complexes. *J Assist Reprod Genet*, 18(2): 97-105. DOI: 10.1023/a:1026534725483.
- Çevik M, Şen U, Kocyigit A, Soydan E, Kuran M. 2011. Effects of serum, gonadotropins, epidermal growth factor and estradiol 17-Beta on cumulus expansion and nuclear maturation of bovine oocytes. *J Fac Vet Med, University of Kafkas*, 17(6): 1009-1014.
- Cevik M, Kocyigit A, Sen U, Kuran M. 2014. Can commercial human embryo culture media be used in bovine embryo culture? *J Fac Vet Med, University of Kafkas*, 20(1): 149-153.
- Duque P, Gomez E, Diaz E, Facal N, Hidalgo C, Diez C. 2003. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture in vitro. *Theriogenology*, 59(3-4): 889-899. DOI: 10.1016/s0093-691x(02)01134-2.
- George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, Donnay I. 2008. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: Embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*, 69(5): 612-623. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.11.008
- Grad I, Gajda B, Smorag Z. 2010. Effect of plant protein supplementation on in vitro development of porcine embryos. *Animal Sci Papers Rep*, 28(3): 271-279.
- Korhonen K, Kananen K, Ketoja E, Matomaki J, Halmekytö M, Peippo J. 2010. Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. *Reprod Domest Anim*, 45(1): 42-49. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01203.x.
- Lonergan P, Fair T, Forde N, Rizos D. 2016. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 86(1): 270-277. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.040.
- Mingoti GZ, Castro VSDC, Meo SC, Barretto LSS, Garcia JM. 2011. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 47(5-6): 361-367. DOI: 10.1007/s11626-011-9400-0.
- Motohashi HH, Taniguchi R, Sakamoto J, Sankai T, Kada H. 2017. Live, full-term mouse pups from oocytes grown and matured in vitro with serum substitutes. *Reprod Biol*, 17: 180-184.
- Parl YH, Gong SP, Kim HY, Kim GA, Choi JH, Ahn JY, Lim HM. 2013. Development of a Serum-free defined system employing growth factors for preantral follicle culture. *Mol Reprod Dev*, 80(9): 725-733. DOI: 10.1002/mrd.22204.
- Sağırkaya H, Üstüner B. 2010. Replacement of fetal calf serum with two different synthetic sera in in vitro maturation medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 29(2): 51-56.
- Sakurai M, Suzuki C, Yoshioka K. 2015. Effect of knockout serum replacement supplementation to culture medium on porcine blastocyst development and piglet production. *Theriogenology*, 83(4): 679-686. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.003.
- Smetenina IG, Tatarinova LV, Krivokharchenko AS. 2006. In vitro fertilization of bovine oocytes in protein-free culture system. *Ontogenez*, 37(6): 438-443.
- Sen U, Kuran M. 2018. Low incubation temperature successfully supports the in vitro bovine oocyte maturation and subsequent development of embryos. *Asian-Australas J Anim Sci*, 31(6): 827-834.