

## TAVŞAN OVİDUKTAL OOSİTLERİNİN İN VİTRO FERTİLİZASYONUNDA FÖTAL BUZAĞI SERUMU VE KUMULUS HÜCRELERİNİN ETKİLERİ\*

(Effects of Cumulus Cells and Fetal Calf Serum on In Vitro Fertilization of Rabbit  
Oviductal Oocytes)

Serpil SARIÖZKAN<sup>1</sup>

Necmettin TEKİN<sup>2</sup>

1. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara
2. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'ı Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara

### ÖZET

Bu çalışma tavşan oviduktal oositlerinin in vitro fertilizasyonunda kumulus hücreleri ile fötal buzağı serumunun etkilerinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada 24 Yeni Zelanda Beyaz dişi, 2 Yeni Zelanda Beyaz erkek tavşan kullanılmıştır. PMSG ile süperfollikülasyon ve HCG ile süperovulasyon oluşturulduktan sonra BSA içeren PBS ile ovidukt yıkanarak kumulus oosit kompleksleri (COC) toplanmıştır. Oositlerin bir kısmı kumulus hücreleriyle birlikte diğer kısmı ise kumulus hücrelerinden ayrılarak fertilizasyona alınmıştır. Gametler fertilizasyon için mDM'de 5 saat inkübe edilmiştir. Kumulus hücreleri ve Fötal Buzağı Serumun, bölünme oranları üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla zigotlar % 20 FCS ilave edilmiş olan Ham's F-10 ile FCS ilave edilmemiş Ham's F-10 mediumuna alınarak 18-21 saat kültüre edilmiştir. Fertilizasyonun değerlendirilmesi oositlerin bölünme oranları saptanarak yapılmıştır. Bölünme oranları kumuluslu oositlerde % 20 FCS bulunduran Ham's F-10 mediumunda % 72.2, FCS bulundurmayan Ham's F-10 mediumunda ise % 66.7 bulunmuştur. Kumulussuz oositlerde ise bölünme oranları % 20 FCS bulunduran Ham's F-10 mediumunda % 68.6, FCS bulundurmayan Ham's F-10 mediumunda ise % 55.3 olarak bulunmuştur (P>0,05).

Sonuçların istatistiksel açıdan önemli olmamasına karşın tavşan zigotu kültür mediumunda serum ve kumulus hücrelerinin kullanımının olumlu etkileri saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Fötal buzağı serumu, in vitro fertilizasyon, kumulus hücreleri, oosit, tavşan

### SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effects of fetal calf serum and cumulus cells on in vitro fertilization of rabbit oviductal oocytes.

In this study, 24 female and 2 male New Zealand White rabbits were used as donors of gametes. Following the induction of superstimulation with PMSG, and ovulation with hCG, cumulus oocyte complexes (COC) were collected by flushing the oviducts with PBS supplemented with BSA. Some of the oocytes were used in fertilization with cumulus cells others were used without cumulus cells. Gametes were cultured for 5 hours in mDM for fertilization. Then, presumptive zygotes were placed in one of the following two media for 18 to 21 hours to determines the effect of serum supplementation and cumulus cells on cleavage rates: Ham's F-10 alone, supplemented with 20% FCS. Fertilization was assessed by detection of oocytes cleavage rates. Cleavage rate were 72.2 % oocytes with cumulus cells for Ham's F-10 supplemented with 20% FCS, 66.7 % oocytes with cumulus cells for Ham's F-10 alone and 68.6 % oocytes without cumulus cells for Ham's F-10 supplemented with 20% FCS, 55.3 % oocytes without cumulus cells for Ham's F-10 alone (P>0,05).

Although differences were not statistically significant, numerical differences supported the use of serum and cumulus cells in rabbit zygote culture media.

**Key Words:** Cumulus cells, fetal calf serum, in vitro fertilization, oocyte, rabbit.

\* Aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiş olan bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No : 2001-08-10-027).



## GİRİŞ

Avrupa tavşanının atası *Oryctolagus cuniculus*dur. Tavşanlarda düzenli bir östrus siklusu görülmez. Ovulasyon çiftleşmeden sonra, LH (Luteinizing Hormon) ve hCG (Human Chorionik Gonadotrophin) enjeksiyonlarıyla, dişinin fiziksel ya da erkek hayvanla mekanik uyarımından 10-13 saat sonra oluşur (12). Süperfollikülasyon ve süperovulasyonun temel amacı belli bir zamanda bir hayvandan elde edilen kullanılabilir embriyoların sayısını artırmaktır (13). Bu amaçla eksojen gonadotropinler birçok laboratuvar hayvanı ve çiftlik hayvanlarında başarı ile kullanılmaktadır (3, 16). Süperovulasyonu indüklemek için FSH (Follicle Stimulating Hormon), çoğu embriyo transfer merkezinde yarılanma ömrünün kısa oluşu ve kesin cevap vermesi gibi avantajlara sahip olmasından dolayı tercih edilmektedir. PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) süperovulasyonun uyarılmasında daha zayıf yanıt oluşturması dezavantajı yanında daha ucuz ve kolay temin edilebilir olması nedeniyle potansiyel bir kaynak olarak kabul edilir (29).

Sanbuissho ve Threlfal'a (23) göre maturasyon olayı kumulüs hücrelerinin genişlemesi, oositin metafaz 1 safhasına girerek, nükleer membranının bozulması, ilk polar cisimciğin çıkışı ve oositin metafaz 2 safhasına geçmesi olarak tanımlanır.

Kumulüs hücrelerinin fertilizasyon sırasındaki rolleri tam olarak bilinmemekle birlikte görevleriyle ilgili çeşitli olasılıklar vardır. Bunlar:

- 1- Kumulüs hücreleri, hiperaktif motiliteli spermatozoanın oosit içine girişini sağlarken, anormal spermatozoanın kumulüs matriksi içine girişini mekanik olarak engeller.
- 2- Kumulüs hücreleri spermatozoanın kapasitasyonu ve oosit içine penetrasyonu için gereken uygun mikroçevreyi oluşturur.

3- Kumulüs hücreleri normal fertilizasyon sırasında oosit içinde, zona pellusidada veya ooplazmada arzu edilmeyen değişimleri engeller (26). Kumulüs hücreleri ile ovum arasındaki mekanizmanın özellikle in vitro fertilizasyon sırasında akrozom reaksiyonuna olan etkisinin tam olarak bilinmemesine rağmen bu hücrelerin in vitro gelişimde yararlı etkilere sahip kimi faktörleri ürettiğine inanılmaktadır (10).

Çoğu memelide in vivo ve in vitro koşullarda fertilizasyon sırasında oosit kumulüs hücreleriyle birlikte bulunmaktadır. Kumulüs hücrelerinin fertilizasyondaki önemi türlere göre değişiklik göstermektedir. Sığırlarda kumulüs hücrelerinin ovulasyondan 10 saat sonra kaybolduğu bildirilmiştir (14). Sığırlarda ve domuzlarda in vitro fertilizasyondan önce kumulüs hücrelerinin ayrılmasının spermatozoa penetrasyonunda azalmalara neden olduğu belirtilmiştir (35, 28, 34). Bununla birlikte farklı fare ırklarında kumulüs hücrelerinin kaldırılmasının fertilizasyon oranını etkilemediği ve kumulüs hücrelerinin fertilizasyon sırasında çok önemli olmadığı ancak birçok türde in vitro fertilizasyon oranını arttırdığı ileri sürülmüştür (31).

İn vitro fertilizasyonun başarılı olabilmesi gonadlarda gametlerin nükleer ve sitoplazmik maturasyonun gerçekleşmesi, dişi ve erkek genital kanalında gametlerin fertilizasyon yeteneğinin gelişmesi, hiperaktiviteye sahip dölleyebilir spermatozoanın optimal yoğunluğu ile ilk polar cisimcikli döllenebilir ovumun varlığına bağlıdır (13).

Oh ve Brackett (20) ovaryum yüzeyinden topladıkları tavşan oositlerin in vitro tohumlamasını takiben yapılan incelemelerde 1-1.5 saat sonra vitellus içerisine spermatozoon penetrasyonunu, 3 saat sonra erkek pronükleusun oluştuğunu ve 2. polar cisimciğin atıldığını, 6 saat sonra erkek ve dişi pronükleuslarının şekillendiğini belirtmişlerdir.

Embriyoların in vitro ortamda gelişme ve canlılıklarını devam ettirebilmeleri için kullanılacak mediumların türlere göre değişiklik gösterebilen enerji ve protein kaynaklarını da içermesi gerekmektedir. Piruvat, laktat ve glukoz enerji kaynağı olarak, ısı ile inaktive edilmiş çeşitli serum ve serum albumini ise protein kaynağı olarak kullanılmaktadır (11).

Tajik ve ark. (28) farklı protein kaynağı ilavelerinin sıgır in vitro fertilizasyonunda spermatozoa penetrasyonunu etkileyebileceğini ve protein ilavesinin oositler kumulus hücreleriyle çevrili iken gerekmediğini ancak kumulus hücrelerinden ayrılmış ise gerekli olduğunu bildirmiştir.

Serumun siklik adenosin monofosfat, kateşolamin, vitamin, büyüme faktörleri, lipid ve albumine bağlı olarak pozitif etkisinin olduğu, yağ asidi ve lipid komponentleri içererek hücrel stabilizasyonu ve zarar görmüş membranların yeniden yapılanmasını sağladığı bildirilmektedir (18, 32). İn vitro embriyo gelişiminde serumun bifazik etkiye sahip olduğu ve iki hücreli basamaktan morula basamağına kadar embriyo gelişiminde yararlı bir etkisi görülmezken, moruladan blastosiste gelişimde, blastosist sayısının artışı ve hatchingin şekillenmesinde yararlı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (33). Brinster (5) fare embriyolarının tek hücreliden morula safhasına gelişim sürecinde protein içeriğinin % 25'inin azaldığı, morula safhasından önce embriyoların eksojen kaynaklardan protein sentezinin ve aminoasit alımının düşük olduğu, morula safhasından sonra protein içeriğindeki azalmanın durduğu ve blastosist formasyonunun şekillenmesiyle total proteinde artış olduğu bildirilmiştir. Tavşan embriyolarının herhangi bir enerji kaynağının ilave edilmediği mediumda 3 ya da daha fazla embriyonal bölünme için yeterli endojen enerji kaynaklarına sahip olduğu bildirilmiştir (15, 6).

Çalışma, in vitro fertilizasyon ve in vitro kültür sürecinde tavşan oositlerini çevreleyen kumulus hücreleri ile kültür ortamının protein ihtiyacının karşılanması amacıyla yaygın olarak kullanılan FCS'nin etkilerinin belirlenmesine yönelik tasarlanmıştır.

## **MATERYAL VE METOT**

### **Deney Materyali**

Çalışmada oosit vericisi 6-12 aylık 24 Yeni Zelanda Beyaz dişi ile 10-12 aylık 2 Yeni Zelanda Beyaz erkek tavşan olmak üzere toplam 26 sağlıklı tavşan kullanılmıştır. Tüm dişi tavşanlar deneylerde kullanılmadan 21 gün önce yalancı gebeliğin önlenmesi amacıyla bireysel kafeslere alınmıştır.

### **Medium ve Kültür Koşulları**

Ovidukt yıkanması ve ardından toplanan oositlerin kan ve ovidukt sıvısından ayrıştırılması amacıyla 3 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA, Fraksiyon V, A-9418, Sigma) içeren Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, D-5773, Sigma) kullanılmıştır. Fertilizasyon ve swim-up mediumunun hazırlanabilmesi için defined medium stok solusyonu hazırlanmıştır (Tablo 1). Erkek ve dişi gametlerin fertilizasyonu için Modifiye Defined Medium (mDM), motil spermatozoonların seçimi ve kapasitasyonu için final konsantrasyonu 20 µg/ml heparin (H-3149, Sigma) içeren mDM kullanılmıştır (Tablo 2). Toplanan oositlerden kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla 1 mg/ml Hyaluronidaz enzimi (H-4272, Sigma) içeren mDM kullanılmıştır. Erkek ve dişi gametlerin kültürü amacıyla Ham's F-10 (N- 6635, Sigma) medimu kullanılmıştır. Kullanılacağı gün kültür mediumunun bir kısmına % 20 Fetal Calf Serum (FCS, F-9665, Sigma) eklendi. Tüm mediumlar kullanımdan en az 1 saat önce 38° C' de % 5 CO<sub>2</sub> ve % 90-100 nem içeren inkübatörde ekilibre edilmiştir.

**Tablo 1.** Defined Medium Stok solüsyonu

Madde	g/ 500ml
NaCl*	3,2750
KCl*	0,1500
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O*	0,0565
*Bu maddeler kuru olarak tartılıp üzerine 500 ml steril bidistile su eklendi.	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1650
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0530
Penisilin G Sodyum tuzu (P-3032, Sigma)	0,0154

**Tablo 2.** Modifiye Defined Medium

Kimyasal Madde	g/ 50 ml
Glukoz	0,1250
NaHCO <sub>3</sub>	0,1552
Na-pyruvat	0,006875
BSA	0,3
Caffein	0,05
Fenol Red	5µg
Bu maddeler tartılıp Defined Medium Stok solüsyon ile 50 ml'ye tamamlandı.	

### Oositlerin Toplanması

Donör hayvanlara 24 saat arayla 3 kez 75 IU PMSG (Folligon, 1000 IU/ flakon, İntervet) kas içi yolla verildi. Son PMSG enjeksiyonundan 24 saat sonra ovulasyonları sağlamak için, 100 IU HCG (Pregnyl ampül, 500 IU/ml, Organon) damar içi yolla uygulanmıştır. Oositler, hCG uygulamasından 13-15 saat sonra, oviduktun fimbria ovarikadan uterotubal birleşim yerine doğru yıkanmasıyla toplanmıştır. Toplanan oositler PBS ile birkaç kez yıkandıktan sonra stereo mikroskop altında düzenli kumulus hücreleri ve homojen ooplazmaya sahip olanlar seçilerek birkaç kez mDM ile yıkanmıştır. Seçilen oositlerin bir kısmı COC olarak fertilizasyona alınırken, diğer kısmı ise 1 mg/ ml hyaluronidaz içeren mDM ile birkaç dakika pipete edilerek kumulus hücrelerinden ayrılmıştır.

### Spermanın Hazırlanması

Erkek tavşanlardan sun'i vajen yardımıyla sperma alındıktan sonra jel kısım uzaklaştırılmıştır. Canlı ve motil spermatozoonların seçilmesi amacıyla spermaya swim-up yöntemi uygulanmıştır. Bunun için 1 ml mDM bulduran bir test tüpünün dibinde 200 µl sperma tabakalandırılıp 38°C, % 5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde 1 saat bekletilmiştir. Bu sürenin bitiminde tüpler üzerindeki 0.8 ml' lik kısım santrifüj tüpüne aktarılarak 500 g' de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atılarak dipteki pellet kısım ayrı bir tüpe alınmıştır. Bu pelet kısımdan yoğunluk tayini yapılmıştır. Sperma final konsantrasyonu, fertilizasyon ortamında 10<sup>5</sup> spp/ml olacak şekilde kapasitasyon mediumuyla sulandırılarak %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 15 dakika inkübe edilmiştir.

### İn Vitro Fertilizasyon

Erkek ve dişi gametlerinin fertilizasyonu amacıyla içerisinde 95 µl mDM bulduran her bir mikrodamlı içerisinde, 5-10 adet kumuluslu ve kumulussuz oositlerden ayrı olarak konulmuştur. Üzerine final konsantrasyonu 10<sup>5</sup> spp/ml olacak şekilde hazırlanan spermadan 5 µl ilave edilmiştir. Oosit ve spermatozoonlar 38 °C' ye ayarlanmış % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 5 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda fertilizasyon mediumundan alınan kumuluslu ve kumulussuz oositler ayrı olarak bir kısmı % 20 FCS içeren Ham's F-10 kültür mediumuna, diğer kısmı da serum eklenmeyen kültür mediumuna aktarılarak 18-21 saat süreyle kültür edilmiştir.

### Fertilizasyonun Değerlendirilmesi

Kültür süresinin tamamlanmasından sonra embriyoların gelişim durumları, bölünmelerinin homojenliği, blastomerlerin büyüklükleri, sitoplazmalarının sağlıklı görünüşleri ve dejeneratif değişiklikler dikkate alınarak fertilizasyon yönünden kontrolleri

yapılmıştır. Bölünmenin gözlemlendiği ve düzenli blastomerlere sahip iki hücreli basamağa ulaşmış olan ovumlarda fertilizasyonun gerçekleştiği kabul edilmiştir (2).

Çalışmanın istatistik aşamasında, in vitro kültür periyodu süresince kumulus hücrelerinin varlığının ve kültür ortamına katılan FCS'nin etkisinin belirlenebilmesi amacıyla kikkare testinden yararlanılmıştır (28).

### BULGULAR

#### Süperovulasyon Uygulamalarına ait Bulgular

Ovaryumlarda çeşitli gelişme safhalarında 120 adet patlamamış follükül, 184 adet

ovulasyon odağı sayılmıştır. Hayvan başına ortalama  $5.00 \pm 0.59$  adet patlamamış follükül,  $7.67 \pm 1.22$  adet korpus hemorajikum sayılmıştır. PMSG ve hCG hormonunun etkisiyle toplam 304 adet follükülün geliştiği ve bunun 184'ünün ovulasyona uğradığı gözlenirken % 60.52 ovulasyon oranı belirlenmiştir.

#### Ovidukt Yıkaması Bulguları

Ovidukt yıkaması sonucu 24 tavşandan toplam 158 adet, hayvan başına ortalama  $6.58 \pm 1.09$  adet oosit elde edilmiştir. Yapılan çalışmada ovaryum reaksiyonları ve ovidukt yıkamasından elde edilen bulgular Tablo 3'de bildirilmiştir.

**Tablo 3.** Süperovulasyon hormon uygulaması ardından ovaryumlarda ve ovidukt yıkantısında gözlenen toplam değerler

Hayvan Sayısı (n)	Patlamamış Follükül Sayısı	C. Hemorajicum Sayısı	Oosit Sayısı
24	120	184	158
( $X \pm S_x$ )	$5.00 \pm 0.59$	$7.67 \pm 1.22$	$6.58 \pm 1.09$

#### İn Vitro Fertilizasyon Bulguları

İnkübasyon periyodu sonunda yapılan mikroskopik muayenelerde düzgün zona pellusida yapısı ile düzenli bölünme gösteren oositler fertilize olarak değerlendirilmiştir. Düzenli blastomerlere, kollabe zona pellusida ile homojen olmayan ooplazmaya sahip oositlerin ise dejenerasyona uğradıkları kabul edilmiştir. Kumuluslu tavşan oositlerinde %20 FCS içeren kültür ortamında bölünme oranı

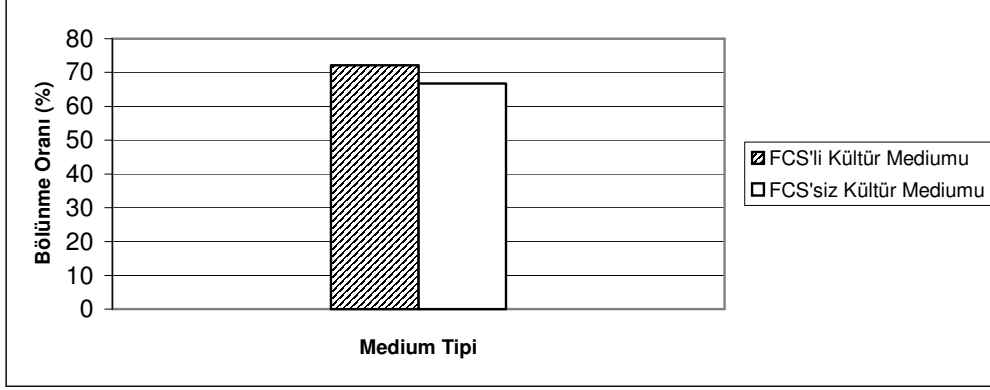
%72.2, kumulussuz oositlerde % 68.6 bulunurken, serum içermeyen kültür ortamında ise bölünme oranı kumulussuz oositlerde %66.7, kumulussuz oositlerde ise %55.3 olarak saptanmıştır. Kumulus hücrelerinin olumlu etkilerinin görülmesine rağmen istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). Yapılan çalışmada kumulus hücreleri ile FCS'nin in vitro fertilizasyondaki etkileri Tablo 4'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Mature tavşan oositlerinde in vitro fertilizasyon bulguları

MEDIUM TİPİ	OOSİT TİPİ					
	Kumulussuz Oosit			Kumulussuz Oosit		
	Seçilen	Fertilize		Seçilen	Fertilize	
		(n)	(%)		(n)	(%)
Ham's F-10+FCS	36	26	72.2	35	24	68.6
Ham's F-10	33	22	66.7	38	21	55.3
<b>Genel Toplam</b>	69	48	69.6	73	45	61.6

Kültür periyodunun sonunda %20 FCS içeren Ham's F-10 mediumunda kumululu oositlerde bölünme oranları % 72.2 (26/36),

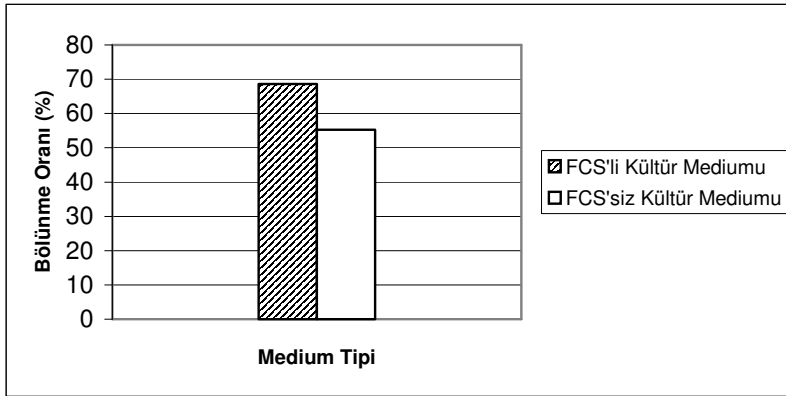
FCS içermeyen Ham's F - 10 mediumunda ise % 66.7 (22/33) olarak kaydedilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. İn vivo mature kumululu tavşan oositlerinin IVF'nunda FCS'nin etkileri

Kumulussuz oositlerde ise inkübasyon periyodunun sonunda bölünme oranları % 20 FCS içeren Ham's F-10 kültür mediumunda % 68.6 (24/35) ve FCS içermeyen Ham's F-10 kültür mediumunda ise % 55.3 (21/38) olarak

kaydedilmiştir (Şekil 2). Kültür ortamına serum ilavesinin olumlu etkileri görülmesine rağmen istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır ( $P > 0.05$ ).



Şekil 2. İn vivo mature kumulussuz tavşan oositlerinin IVF'nunda FCS'nin etkileri

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada in vitro embriyo üretiminde optimal in vitro kültür koşullarının belirlenmesine katkı sağlamak amacıyla in vitro fertilizasyon süresince etkileri olabilecek bazı parametreler değerlendirilmiştir. Oluşturulan in vitro şartlarda dişi gametlerine sarılı olan

kumulüs hücreleri ile kültür mediumuna katılan FCS'nin fertilizasyonla ilişkisi araştırılmıştır.

Kumulüs hücreleriyle fertilizasyona alınan oositlerde bölünme oranı % 72.2 (26/36), kumulüs hücrelerinden ayrılarak

fertilizasyona alınanlarda ise % 68.6 (24/35) olarak saptanmıştır. Mature tavşan oositlerinde, kumulus hücrelerinin in vitro fertilizasyon oranını artırdığı gözlemlenmiş ancak bu olumlu etkinin istatistiki açıdan önemli olmadığı saptanmıştır ( $P>0,05$ ).

Chang (7) ovule olmuş tavşan ovumundan kumulus hücrelerini ayırıp, çiftleşmiş dişilerin oviduktlarına transferini takiben fertilizasyonu gerçekleşmiş ovumları geri topladığını bildirmiştir. Bedford ve Chang (4) benzeri bir sonuçla hyaluronidaz enzimi ile muamele ettikleri oositlerden kumulus ve korona hücrelerinin kaldırılmasının in vitro fertilizasyon oranının artışına herhangi bir katkısının olmadığını bildirmiştir. Chang ve Bedford (8)'da kumulus hücrelerinin fertilizasyonu önemli derecede etkilemediği ancak koronanın ovumu koruyucu bir rol oynadığını bildirmiştir. Dickman (9) yaptığı çalışmada kumuluslarından ayrılmış ovumların fertilizasyonundaki spermatozoa sayısının, çiftleşmiş dişilerdeki natif ovumunkinden önemli derecede düşük olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmalarda araştırmacıların ulaştıkları sonuçlar sunulan çalışmanın sonuçlarına paralellik göstermektedir. Mills ve ark. (19) PMSG-hCG injeksiyonunu takiben 10 saat sonra tavşan folliküler ovumları toplamışlardır. Fertilizasyon mediumunda oosit ve spermatozoitler 23-25 saat inkübe edilmiştir. Toplanan mature kumuluslu oositlerde elde edilen fertilizasyon oranı % 49.5 (171/345) olarak bildirilmiştir. Majumdar (17) tavşanlara uyguladığı PMSG-hCG uygulamasından 10 saat sonra folliküllerden aspire ettiği oositlerde in vitro fertilizasyon oranının % 46.05 olduğunu bildirmiştir. Suzuki ve Mastroianni (27) folliküler ovumda fertilizasyondaki başarı oranının tubal ovumdakinden daha düşük olduğunu bildirmiştir. Bu durum, folliküler ovumda fertilizasyonu etkileyen in vitro koşulları kontrol etmenin zor olduğu ve follikül içerisindeki oositlerin maturasyon

oranlarının farklı düzeylerde gerçekleştiği görüşüne bağlanmıştır. Seidel ve ark. (24)'ı ise hyaluronidaz enzimi yardımıyla kumulus ve koronası ayrılmış ovule tavşan oositlerindeki fertilizasyon oranının (% 51), folliküler hücre katmanı ile çevrili oositlerde ulaşılan orandan (% 73) düşük olduğunu belirtmişlerdir. Aynı fertilizasyon ve kültür mediumunun kullanıldığı bu çalışmanın sonuçları sunulan çalışmanın bulgularına benzerlik göstermektedir. Tekeli (30) PMSG-hCG kombinasyonu uygulanmış tavşanlarda HCG injeksiyonundan 16.5-21.5 saat sonra oviduktta yıkayarak toplanan oviduktal oositlerin 145, 102 ve 4'ünün sırasıyla zona pellusida, korona radiata, kumuluslu olduğunu bildirmiştir. Oositlerin in vivo kapasite spermatozoa ile tohumlamalarında in vitro fertilizasyonda % 19.91 (47/236) oranında sonuç elde edilmiştir. Sunulan çalışmada belirtilen fertilizasyon oranının Tekeli (30)'nin bulduğu sonuçtan yüksek olmasının nedeni ovidukt yıkamanın hCG injeksiyonundan 13-15 saat sonra yapılmasına, fertilizasyon ortamının farklı olmasına ve Chang ve Bedford (8)'un belirttiği gibi kumulus hücrelerinin fertilizasyonu önemli derecede etkilemediği ancak koronanın ovumu koruyucu bir rol oynadığı görüşüne bağlanmıştır. Aynı çalışmada ayrıca oositlerin folliküler hücrelerden ayrılmasının, ovulasyondan sonra geçen zamana bağlı olduğu, ovulasyondan 6 saat sonra bir kısım oositlerin kumulus ile korona hücreleri olmadan toplandığı belirtilmiştir.

Sunulan bu çalışmada kültür mediumunda protein kaynağı olarak FCS kullanılmış olup, in vivo mature kumuluslu tavşan oositlerinin serum içeren kültür mediumundaki in vitro fertilizasyon sonuçları sırasıyla % 72.2 ve % 66.7, in vivo mature kumulusuz tavşan oositlerinin serum içermeyen kültür mediumundaki in vitro fertilizasyon sonuçları ise sırasıyla % 68.6 ve % 55.3 bulunmuştur. Serum içeren kültür mediumunda bölünme



oranlarının daha yüksek olmasına karşın grup ortalamaları arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir.

Ahmad ve ark. (1) süperovulasyon tedavisi uyguladıkları dişi tavşanlardan çiftleştirmeyi takiben 24 saat sonra oviduktu yıkayarak 234 adet 2 hücreli embriyo elde etmişlerdir. Sığır serumunun tavşan embriyo kültüründe denemesi amacıyla yapılan kültürde inkübasyonun 24. saatinin sonunda protein ilavesi yapılmayan TCM-199 mediumunun tek başına embriyonik gelişimde yeterli olmadığını ve serum ilavesinin gerektiği belirtilmiştir. Kültürün 24. saatinin sonunda embriyo gelişim oranında serumlu ve serumuz medium arasında bir fark olmadığını ve embriyoların % 50'den fazlasının her iki mediumda da morula basamağına kadar ulaştığı, gelişimin bu safhasında serum ilavesinin yararlı etkisinin görülmediği ve embriyoların bölünmede eksojen enerji kaynaklarından bağımsız olarak endojen enerji kaynaklarını kullandıkları bildirilmiştir. Kültürün 48. saatinde ise embriyoların çoğunun kompakt morula-erken blastosist safhasına ulaştığı ve bu sürede eklenen sığır serumunun gelişim oranını önemli ölçüde arttırdığı belirtilmiştir. Sunulan çalışmada in vitro fertilize edilen ovumlarda çalışılmasına ve kültür süresinin kısa tutulmasına karşın elde edilen sonuç bu çalışmaya paraleldir. Bu durum Kane (15) ve Brinster (6)' in bildirdikleri, tavşan embriyolarının sahip oldukları endojen enerji kaynakları sayesinde mediuma herhangi bir enerji kaynağı ilavesi olmaksızın 3 ila daha fazla bölünmeye uğrayabileceği görüşüne bağlanmıştır. Sellens ve ark. (25) özellikle blastosist basamağındaki embriyonun kültür mediumundaki serbest aminoasitleri kullanabilmek için aminoasit transport sistemine ihtiyaç duyduğunu ve bu safhadaki embriyonik büyümenin eksojen protein kaynağına bağlı olduğunu bildirmiştir.

Saito ve ark. (22) fare embriyolarının Ham's F-10 mediumunda 24 saatlik kültüründe, embriyonik gelişimde serumlu ile serumuz medium arasında bir fark olmadığını ve fare embriyolarının kültüründe en az % 10 serum konsantrasyonunun sağlanmasının optimal sonuç elde etmek için gerekli olduğunu bildirilmiştir. Ahmad ve ark. (1) tavşan embriyosunun gelişiminde kültür mediumuna % 15 sığır serumu ilavesinin, maksimum gelişim için yeterli olduğunu belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada kullanılan FCS oranı yukarıdaki çalışmalara paralellik göstermektedir. Onuma ve ark. (21) tavşan embriyolarının zona pellusida kalınlığına, hatching zorluğuna ve müsin tabakasının varlığına bağlı olarak kültürlerinin zor olduğunu belirterek, 2-4 hücreli basamaktan blastosist basamağına kadar kültürlerinde sığır serumu ile tavşan serumu kullanmıştır. Tavşan embriyolarının kültüründe morula safhasına gelişimin sığır serumu kullanıldığında daha yüksek olduğunu ancak blastosiste gelişimin ise tavşan serumu kullanıldığında önemli derecede yüksek olduğu bildirilmiştir.

Al-Hasani ve ark. (2) FSH uygulanmış tavşanlardan, hCG uygulamasını takiben 9 saat sonra aspire ettikleri folliküler oositlerin % 20 FCS içeren Ham's F-10 mediumunda % 82 fertilizasyon oranı elde etmiştir. Sunulan çalışmada elde edilen sonucun daha düşük olmasının nedeni kullanılan fertilizasyon ve kültür mediumlarının aynı olmasına karşın inkübasyon süresinin belirtilen 20-72 saatlik kültür süresinden daha kısa tutulmasına bağlanmıştır.

Sonuç olarak oosit maturasyonunda önemi bildirilen kumulus hücrelerinin, 2 hücreli bölünme aşamasına ulaşmada olumlu etkilerinin olduğu ancak istatistiksel değerlendirilmede önemli olmadığı sonucuna varılmıştır ( $P>0,05$ ). Fertilizasyon süresince kültür mediumu kompozisyonu ile ortam koşulları

optimal ise kumulus hücrelerinin, spermatozoayla oositin birleşmesi ile bölünme safhasında önemli olmadığı düşünülmektedir.

Mediumlara serum ilavesinin pozitif etkisinin görülmesine rağmen aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı sonucuna varılmıştır ( $P>0,05$ ). Embriyonik gelişimde kültür mediumuna serum ilavesinin zamanı ve çeşidinin de önemli olduğu üstelik serum içeriklerinin embriyo canlılığında toksik etkili olabileceği ayrıca serumun ilk bölünmeyi baskılayabileceği ancak morula ve blastosist gelişiminde yararlı olabileceği ya da embriyo üretiminde fertilizasyondan sonra herhangi bir aşamada gerekli görülmediği gibi farklı görüşler de göz ardı edilmemelidir.

Sonuç olarak, PMSG ve hCG hormonları ile süperovulasyonu sağlanan tavşanlardan ovidukt yıkanmasıyla oositlerin toplandığı, seçilen in vivo mature oositlerin in vitro fertilizasyonunda kumulus hücrelerinin ve FCS'nin olumlu etkilerinin görülmesine karşın aradaki bu farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte elde edilen sonuçların kesinlik kazanabilmesi için benzeri çalışmaların kültür süresi daha uzun tutularak, zigotların morula ve blastosist safhasına kadar geliştirilip elde edilen verilerin değerlendirilerek tekrarlanması önerilmektedir. Ayrıca bu sonuçların kullanılan tavşanların sağlık durumlarına, kullanılan natif spermada gözlenebilecek bireysel özelliklere, ortam ve kültür koşullarına göre farklılık gösterebileceği de dikkate alınmalıdır.

#### KAYNAKLAR

1. **Ahmad M, Ozkoca A, İleri IK, Pabuçcuoğlu S, Usta S** (1992). *Effect of variable concentration of bovine serum on rabbit embryo development*. Pakistan Veterinary Journal, 12: 186-189.
2. **Al-Hasani S, Trotnow CS, Hahn, J** (1986). *In vitro fertilization and embryo transfer of pre-ovulatory rabbit oocytes*. European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology, 21: 187-195.
3. **Allison, FT, David, GS, Sansing S, Keller SL** (1997). *Superovulation of New Zealand White Rabbits by Continuous Infusion of Follicle-Stimulating Hormone, Using a Micro-Osmotic Pump*. Laboratory Animals Sci., 47: 313-316
4. **Bedford JM, Chang MC** (1962) *Fertilization of rabbit ova in vitro*. Nature, 193: 898.
5. **Brinster RL** (1967) *Protein content of the mouse embryo during the first five days of development*. Journal of Reproduction and Fertility, 13: 413-420.
6. **Brinster RL** (1970) *Culture of two cell rabbit embryos to morulae*. Journal of Reproduction and Fertility, 21: 17-22.
7. **Chang MC** (1952) *Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo*. Journal of Experimental Zoology, 121: 351.
8. **Chang MC, Bedford JM** (1962) *Fertilizability of rabbit ova after removal of the corona radiata*. Fertility and Sterility, 13: 421.
9. **Dickman Z** (1964) *Fertilization and development of rabbit eggs following removal cumulus oophorous*. Journal of Anatomy, 98: 397.
10. **Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y** (1990) *Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage*. Biology of Reproduction, 42: 114-119.
11. **Gordon I** (1994) *Oocyte Recovery and Maturation*, p. 30-65. In: Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB. International.
12. **Hafez ESE** (1970) *Rabbits, p.273*. Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals. Lea, Febiger, Philadelphia.
13. **Hafez ESE** (1993) *Assisted Reproductive Technology: Ovulation Manipulation*, p. 461-502. In: In Vitro Fertilization/Embryo Transfer, Reproduction in farm animals. 6th Ed. Lea Febiger. Philadelphia.
14. **Hyttel P, Greve T, Callasen H.** (1988). *Ultrastructure of in vivo fertilization in cattle*. Journal of Reproduction and Fertility, 82: 1-13.
15. **Kane MT (1987)** *Minimal nutrient requirements for culture of one cell rabbit embryos*. Biology of Reproduction, 37: 775-778.
16. **Kennely JJ, Foote RH** (1965) *Superovulatory response of pre- and post pubertal rabbits to commercially available gonadotrophins*. Journal of Reproduction and Fertility, 9: 177-188.
17. **Majumdar AC** (1991) *In vitro fertilization of follicular oocytes from gonadotrophin primed rabbit does*. Journal of Animal Science, 61: 535-536.
18. **Menezo Y, Testart J, Perrone D** (1984) *Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture and transfer*. Fertility and Sterility, 42: 750-755.

19. **Mills JA, Jeitles GG, Brackett BG** (1973) *Embryo transfer following in vitro and in vivo fertilization of rabbit ova*. Fertility and Sterility, 24: 602- 608.
20. **Oh YK, Brackett BG** (1975) *Ultrastructure of rabbit ova recovered from ovarian follicles and inseminated in vitro*. Fertility and Sterility, 26: 665-685.
21. **Onuma H, Maurer RR, Foote RH** (1968). *In vitro culture of rabbit ova from early cleavage stages to the blastocyst stage*. Journal of Reproduction and Fertility , 16: 491- 493.
22. **Saito H, Berger, T, Mishell DR, Marrs RP** (1984) *Effect of variable concentration of serum on mouse embryo development*. Fertility and Sterility, 41: 460-464.
23. **Sanbuissho A, Threlfal WR** (1990) *The influence of serum on IVM and fertilization of bovine oocytes*. Theriogenology, 34: 341-347.
24. **Seidel GE, Bowen RA, Kane MT** (1976) *In vitro fertilization, culture, and transfer of rabbit ova*. Theriogenology, 27: 861- 870.
25. **Sellens MH, Stein S, Sherman M** (1981) *Protein and free aminoacid content in preimplantation mouse embryos and in blastocysts under various culture conditions*. Journal of Reproduction and Fertility, 61: 307-315.
26. **Soom AV, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, De Kruif A** (2002) *Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization*. Reproduction in Domestic Animals,37:144- 151.
27. **Suzuki S, Mastroianni L** (1968) *In vitro fertilization of rabbit follicular oocytes in tubal fluid*. Fertility and Sterility, 19: 716- 725.
28. **Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V** (1997) *Biyoistatistik*. 7. Baskı, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
29. **Tajik P, Niwa K, Murase T** (1993) *Effect of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulusintact and cumulus free bovine oocytes matured in culture*. Theriogenology, 40: 949-958.
30. **Taneja M, Pareek PK, Jatkar PR** (1990) *Superovulation and embryo recovery in rabbits (Oryctolagus cuniculus) using different doses of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG)*. Indian Journal of Experimental Biology, 28: 1031-1033
31. **Tekeli T** (1984) *Investigations on in vitro fertilization of rabbit ova*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 31: 186-196.
32. **Vergara MH, Irwin RJ, Moffatt R, Pinkert CA** (1997) *In vitro fertilization in mice: strain differences in response to superovulation protocols and effect of cumulus cell removal*. Theriogenology, 47: 1245- 1252.
33. **Vicente JS, Castro MPV, Garcia ML** (1999) *In vivo survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without protein*. Reproduction Nutrition Development, 39:657- 662.
34. **Wang S, Liu Y, Holyoak GR, Bunch TD** (1997) *The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage- stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media*. Animal Reproduction Science, 48: 37- 45.
35. **Wang WH, Abeydeera LR, Fraser RL, Niwa K** (1995) *Functional analysis using chlor-tetracyclin fluorescence and in vitro fertilization of frozen- thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein free chemically defined medium*. Journal of Reproduction and Fertility, 104: 305- 313.
36. **Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA** (1995) *Cumulus cell function during bovine maturation*. Molecular Reproduction and Development, 40: 338- 344.