

## Boğa Spermatozoonlarında in vitro Kapasitasyon ve Fertilizasyon\*

Necmettin TEKİN, Ali DAŞKIN, Ergun AKÇAY

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'î Tohumlama Anabilim Dalı, 06110 Dışkapı, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 02.02.2000

**Özet :** Araştırmada iki farklı kapasitasyon medium'unda tutularak in vitro kapasite edilen boğa spermatozoonlarının in vitro mature edilmiş oositleri fertilize etme yetenekleri araştırılmıştır.

Mezbahadan sağlanan ovaryumlar 30-35°C' deki serum fizyolojik içinde laboratuvara getirilerek, 2-8 mm çapındaki antral folliküllerden aspirasyon yöntemi ile kumulus oosit kompleksleri toplanmıştır. Toplanan oositler değerlendirildikten sonra maturasyon medium'una aktarılarak %5CO<sub>2</sub> ve %95 nemli atmosferde 38,5°C'de 24 saat inkubasyona alınmıştır. Bu süre sonunda kumulus ekspansiyonu gösteren oositler olgunlaşmış kabul edilerek fertilizasyon ortamına alınmışlardır. Maturasyon medium'u olarak %20 ECS, 10 IU/ml FSH, 10 IU/ml LH içeren Ham's F-10 kullanılmıştır.

Olgunlaşmış oositleri fertilize etmek amacıyla dondurulmuş boğa sperması kullanılmıştır. Motil spermatozoonların kapasitasyonu amacıyla 0,5 mM hipotaurin ve %25 follikül sıvısı içeren mDM solusyonu kullanılmıştır. Hipotaurin için 7 saat, follikül sıvısı için 4 saat inkubasyon uygulanmıştır. Elde edilen sperma süspansiyonu, final konsantrasyon 1-3x10<sup>6</sup> spermatozoon/ml olacak şekilde oositlerin bulunduğu ortama katılmıştır. Oositler ve spermatozoa 18 saat inkubasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda oositler fikse edilmiş ve boyanmışlardır. Oosit sitoplazmasında dişi ve erkek pronukleuslarının gözlenmesi ile fertilizasyon değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, maturasyona bırakılan 878 oositten 385 tanesi (%43,84) mature olarak fertilizasyona alınmıştır. Fertilizasyon sonucunda, hipotaurin ve follikül sıvısı ile kapasite edilen spermatozoonlarda fertilizasyon oranları sırasıyla %34,21 ve %29,23 olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiki değerlendirmede her iki fertilizasyon oranı arasındaki fark p<0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Boğa,Spermatozoon, İn Vitro Kapasitasyon, İn Vitro Fertilizasyon

### In vitro Capacitation and Fertilization of Bull Spermatozoa

**Abstract :** In this study, the fertilizing ability of in vitro capacitated bull spermatozoa in two different capacitation media (Hypotaurine and Follicular Fluid) was investigated.

Ovaries were obtained from slaughterhouse and were transported to the laboratory in saline (0.9% NaCl) at 30-35°C. Cumulus oocyte complexes were collected from antral follicles of 2 to 8 mm in diameter. After collected oocytes were classified, they were transferred to maturation medium. Oocytes were cultured for 24 hours in a 100 ml drops of maturation media overlaid with mineral oil under 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity in air at 38.5°C. At the end of this incubation, oocytes which displayed cumulus expansion were considered as matured. Ham's F-10 was used as the maturation medium containing 20% ECS, 10 IU/ml FSH, 10 IU/ml LH.

Cryopreserved bull semen was used for fertilization of in vitro matured oocytes. Motile spermatozoa were separated by the swim-up technique. MDM solution containing 0.5 mM hypotaurine and 25% follicular fluid was used for the capacitation of separated motile spermatozoa. Hypotaurine treated spermatozoa were incubated for 7 hours and follicular fluid treated spermatozoa were incubated for 4 hours. At the end of these incubations, the obtained sperm suspension was added to fertilization medium. The final concentration of sperm in the medium was 1-3x10<sup>6</sup> sperm/ml. Oocytes and sperm were cocultured for 18 h. At the end of this culture period, oocytes were fixed and stained for evaluation of fertilization. Oocytes were considered to be fertilized when female and male pronuclei were visible in the cytoplasm.

Finally, from 878 collected oocytes, 385 oocytes were matured (43.84%). Fertilization rates of capacitated spermatozoa with hypotaurine and follicular fluid were 34.21% and 29.23% respectively. The difference between fertilization rates were found to be significant (p<0.01).

**Key Words:** Bull, Spermatozoon, In Vitro Capacitation, In Vitro Fertilization

\* Bu araştırma TÜBİTAK (VHAG 1342) ve A. Ü. Araştırma Fonu (97.10.0007) tarafından desteklenmiştir.

## Giriş

In vitro embriyo üretiminde özellikle spermatozoa kapasitasyonu ve oosit maturasyonu in vitro fertilizasyonda güçlükler neden olan iki biyoteknolojik basamaktır.

Bütün memeli türlerinde spermatozoa dışı genital kanalında ilk bırakıldığı anda ovumu fertilize etme yeteneğinde değildir. Bunun için fertilizasyona hazırlık sürecinin başlaması gerekir. Bu süreç iki aşamada incelenmektedir: Birinci aşama, başlangıçta meydana gelen membransel değişiklikleri kapsar ki, bu olaylar aynı zamanda ikinci aşamayı başlatır. Bunlara sırasıyla kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu adı verilmektedir. Dışı genital kanalında lokalize olan bazı maddelerin bu olaylardan sorumlu olduğu bilinmektedir. Glukozaminoglikanlar, kondriotin sülfatlar, heparin benzeri ve henüz tanımlanmamış bazı maddeler dışı genital kanalından izole edilmişlerdir. Spermatozoa kapasitasyonu, bu maddelerin etkisi ile spermatozoa plazma membranına bağlanmış örtü antijenleri de denilen glikoprotein doğallı makromoleküller olan seminal plazma komponentlerinin spermatozoon yüzeyinden uzaklaştırılması olarak tanımlanabilir (1, 2).

Spermatozoa'nın kapasitasyonu başarılı bir in vitro fertilizasyon (IVF) olayında en büyük engellerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Sığırlarda yapılan çalışmalarda sperma bu amaçla hiperozmotik bir medium'la muamele edilebilmektedir. Buna ek olarak spermanın glikozaminoglikanlar ile muamele edildikten sonra oositlerle muamelesinin, fertilizasyon oranlarını önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (3). Ayrıca Guerin ve Menezo, (4) taurine ve hipotaurin'in spermatozoa canlılığını ve kapasitasyonunu etkilediğini ve antioksidan olarak peroksidatif zararlara karşı koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar (5, 6) ise hipotaurin, heparin ve epinefrini birlikte kullanarak spermatozoa motilitesini ve kapasitasyonunu indüklemişlerdir. Boatman ve ark. (7) da hipotaurinin spermatozoa motilitesinin reaktivasyonunda etkili olduğunu, ancak bunun epinefrin ve penisilamin ile birlikte kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir.

McNutt ve ark. (8) memeli spermatozoonlarının folliküler ve oviduktal sıvı ile inkubasyonu sonucu, spermatozoonların motilitesinde ve tek yönlü hareket biçiminde belirgin bir artış olduğunu buna ek olarak kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunun indüklendiğini bildirmişlerdir.

Başlangıçta yapılan in vitro fertilizasyon çalışmalarında spermatozoa kapasitasyonu için in vivo olarak ovidukt yada uterusu inkübasyona bırakılırken ilk kez Iritani ve ark. (9) kimyasal olarak belirli bir medium'da in vitro kapasitasyon olayını gerçekleştirmişlerdir. Daha sonraki araştırmalarda boğa spermatozoasının kapasitasyonu amacıyla tuzlu solusyonlar sıklıkla kullanılmıştır. Özellikle BSA destekli Tyrode's Lactate (TALP), Modify Defined Medium (mDM), Brackett-Oliphant medium (BO), Biggers-Whitten-Whittingham medium (BWW), Krebs Ringer bikarbonat medium (KRB) en çok kullanılan kapasitasyon ve fertilizasyon ortamlarıdır. Bununla birlikte boğa spermatozoasında kapasitasyonun indüklenmesi amacıyla bu medium'lara heparin, hipotaurin, follikül sıvısı, oviduktal sıvı, Ca iyonu (A 23187) ve kafein gibi maddeler katılmaktadır. Utsumi ve ark. (10), Saeki ve ark. (11) 0,5mM hipotaurin ile 6-8 saat; Bavister ve ark. (12), Kato ve Iritani, (13), Parrish ve ark. (14), Fukui ve ark. (15) 5-100 µg heparin ile 0-20 dakika; Aoyagi ve ark. (16) 0,1µM kalsiyum iyonoforu A 23187 ile 30 saniye; Sanbuissho ve Threlfall (17, 18) %25 follikül sıvısı ile 4 saat inkubasyon sonrası boğa spermatozoasında kapasitasyonun indüklendiğini bildirmişlerdir.

Miller ve Hunter, (19) yaptıkları bir araştırmada albumin, pyruvat ve laktat içeren modifiye Tyrode's medium (TALP)'unda kapasitasyonu indüklemek için 100mg/ml condriotin sülfat kullanmışlar ve bu maddenin kapasitasyon ve akrozom reaksiyonuna etkili olmadığını bildirmişlerdir. Wheeler ve Seidel, (20) boğa spermatozoasının kapasitasyonu için lisofosfatidilserin (LPS), lisofosfatidilkolin (LPC), lisofosfatidil etanolamin (LPE), lisofosfatidilinositol (LPI) kullanmışlar ve 3 saatten daha az bir sürenin kapasitasyon için yeterli olduğunu maksimum oosit penetrasyonunun da LPE ile gerçekleştiğini saptamışlardır. Aoyagi ve ark. (16) ise spermatozoa kapasitasyonu için sadece kafeinin yeterli olmadığını, kafein ile birlikte Ca-iyonoforu kullanılması ile kapasitasyonun indüklendiğini bildirmişlerdir.

IVF' da bir diğer önemli basamak in vitro oosit maturasyonudur (IVM). Oosit maturasyonunda primer oositlerin klasifikasyonları yapıldıktan sonra yapısında oositin sitoplazmik olgunlaşmasını destekleyici maddelerin, ayrıca kromozomal olgunlaşmanın, yani mayoz bölünmenin tamamlanabilmesi için gerekli gonadotropinlerin bulunduğu besi yerlerinin içine aktarılıp yaklaşık 24-26 saat %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli ortamda 38-39°C' de kültüre edilmesi gerekmektedir. Kültür ortamı olarak değişik araştırmalarda farklı vasatlar kullanılmıştır. Özellikle TCM 199, Ham's F-10, Ham's F-12, BO

Medium, m-199, SFRE 199-2, Waymouth's medium gibi kültür ortamları hormon (FSH, LH), serum (Oestrus cow serum, Fetal calf serum), bikarbonat, pyruvat, laktat ve antibiyotik ilaveleri yapılarak bir çok araştırmada kullanılmıştır (3, 9, 11, 12, 14, 15, 21, 22, 23, 24).

İn vitro maturasyonu yapılmış oositlerin gelişme performansı, genelde in vivo maturasyon geçirmiş oositlerden daha düşük olmaktadır. Bu nedenle konu üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Lu ve ark. (25) östrustaki sığır serumunun, Younis ve ark. (26) proöstrus serumunun, de Fukushima ve Fukui (27), Saeki ve ark. (28) hormonal desteğin ve Leibfried ve ark. (29) granuloza hücrelerinin in vitro maturasyona pozitif etki ettiğini açıklamalarından sonra, birçok maturasyon medium'u bu çeşit maddelerle desteklenmiştir. İn vitro mature edilmiş sığır oositlerinin fertilizasyonu ilk olarak Iritani ve Niva (30) tarafından bildirilmiştir. Daha sonra Brackett ve ark. (31) IVM' dan ilk buzağıyı elde etmişlerdir.

Saeki ve ark. (28) %10 FCS, 10 µg/ml LH ve 0,2 mg/ml estradiol ile desteklenmiş TCM-199 ile mature ettikleri oositleri, 0,5mM hipotaurin ile 7 saat kapasite edilmiş spermatozoa ile fertilize ettiklerinde fertilizasyon sonrası 7. saatte dişi pronukleus formasyonlarının oluştuğunu, 9. saatte ise erkek ve dişi pronukleuslarının gözlenebildiğini bildirmişlerdir.

Sanbuisscho ve Threfall (18) farklı miktar ve oranlarda serum ve gonadotropin ilavelerinin in vitro maturasyon ve fertilizasyon üzerine etkilerini inceledikleri araştırmalarında %10 ECS, 1mg/ml FSH ve 2 IU/ml hCG destekli Ham's F-10'un maturasyon ve fertilizasyonda (%64, %31) en iyi sonuçları verdiğini saptamışlardır. Aynı araştırmada fertilizasyon için gerekli olan spermatozoa kapasitesinde %25 follikül sıvısı içeren Ham's F-10 kullanılmıştır.

Bavister ve ark. (12) ve Papuççuoğlu ve ark. (32) IVM ve IVF' un ucuz embriyo üretimine, nükleer transferlere ve gen manuplasyonlarına olanak sağlaması gibi faydaları bulunduğunu, ancak bunun yanında bu yöntemle morula-blastosist aşamasında embriyo üretiminin çok değişik yöntemler denenmesine karşın düşük (%25-40) olduğunu, maturasyon ve fertilizasyonda hala problemler yaşandığını bildirmişlerdir. Özellikle döllenmiş oositlerin büyük bir oranının bölünme aşamasında bloke olduğuna ve pronukleus yada 2-4 hücreli dönemde kaldıklarına değinmişlerdir. Bu nedenle aynı araştırmacılar farklı maturasyon ve kültür ortamlarını denedikleri araştırmalarında defined kültür medium formülasyonlarının daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, boğa spermatozoonlarının kapasitesinde kullanılan iki farklı maddenin, in vitro mature edilmiş oositlerin fertilizasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

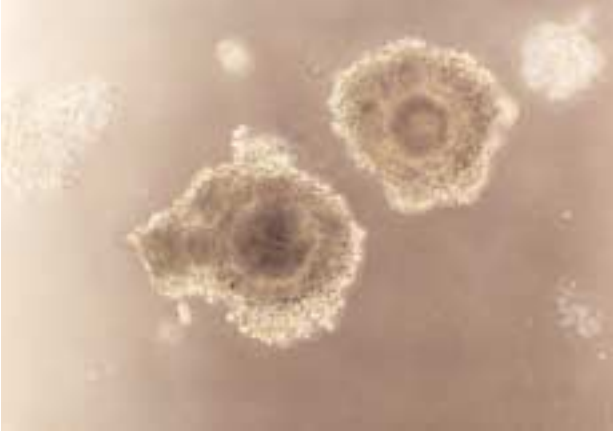
## Materyal ve Metot

Çalışmada materyal olarak, mezbahada kesilen değişik ırktan inek ve düvelerin ovaryumları kullanılmıştır. Ovaryumlar ortalama 33°C (30-35)' deki serum fizyolojik ile 3 saat içinde laboratuvara getirilerek, ortamda bulunan kanın uzaklaştırılması ve olası kontaminasyonların önüne geçilmesi amacıyla aynı sıcaklıktaki serum fizyolojik ile birkaç kez yıkanmış ve bunu takiben oositlerin toplanması aşamasına geçilmiştir. Spermatozoonların kapasitesinde iki farklı kapasite ortamı hazırlanmış ve inkubasyon süreleri sonrasında oositler ile spermatozoonlar birlikte in vitro fertilizasyon ortamına alınmıştır.

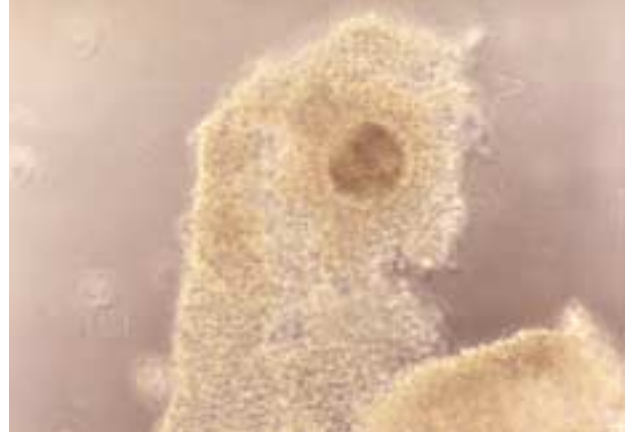
**Oositlerin Toplanması ve Maturasyonu:** Laboratuvara getirilen ovaryumların yüzeyinde bulunan, sağlıklı görünümdeki (çeperi ince, damarlanması normal, hemorajik olmayan, şeffaf) 2-8 mm çaptaki antral folliküllerden 18 G iğne ve 10 ml'lik enjektör yardımıyla aspirasyon yapılarak alınan oositler %1 ECS (Oestrus Cow Serum), 3mg/ml BSA (Sigma, A-9418) içeren PBS (Sigma, D-5773) ile yıkanmışlardır. Elde edilen yıkantı 6'lık plastik petri içerisinde toplanarak stereo mikroskop altında incelenmeye alınmıştır.

Ovaryumlardan elde edilen yıkantılardan oositlerin seçimi sırasında vitellusları homojen görünümde, etrafı sıkı bir şekilde en az 3-4 kat kumulüs hücre sırası ile sarılmış olan kumulüs oosit kompleksleri (COCs, primer oosit) seçilmiş (Şekil 1) ve yıkandıktan sonra maturasyon medium'una aktarılmışlardır. Maturasyon medium'u olarak 0,1 mg/ml FSH, 0,1 mg/ml LH, %20 ECS, 0,0050 g Na-pyruvat ve antibiyotik (penisilin 100 IU/µl, 100 mg/ml streptomisin, Sigma, P-0906) içeren Ham's F-10 (Sigma, N-6635) medium'u kullanılmıştır.

Oositlerin maturasyonunda mikrodamlı yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan medium 6'lık plastik petri içine 100 ml'lik damlalar halinde konarak, her 100 ml' lik damlaya 10-20 oosit transfer edilmiştir. Daha sonra üzeri mineral yağ ile örtülerek %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda 38,5°C'de 24 saat inkubasyona alınmıştır. İnkubasyon sonrası kumulüs ekspansiyonu gösteren oositler olgunlaşmış olarak kabul edilerek fertilizasyon aşamasına alınmışlardır (Şekil 2).



Şekil 1. Toplanan oositlerde değerlendirilen kumulus oosit kompleksleri (x100) .



Şekil 2. Oositlerde maturasyon sonrası kumulus ekspansiyonu. (x100).

**Spermatozoa Kapasitasyonu:** Olgunlaşmış oositlerin fertilizasyonunda 0,25 ml'lik payette dondurulmuş boğa sperması, 37°C' deki su banyosunda 20 saniyede çözülmüş, hiperaktif motil spermatozoonların elde edilebilmesi için iki farklı kapasitasyon medium'ndan yararlanılmıştır. Kapasitasyon amacıyla Modify Defined Medium (3,275g NaCl, 0,1500g KCl, 0,1650g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,0530g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,0565g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,0154g Penicillin G ve add. 500ml Isotonic Acidic Saline) kullanılmıştır.

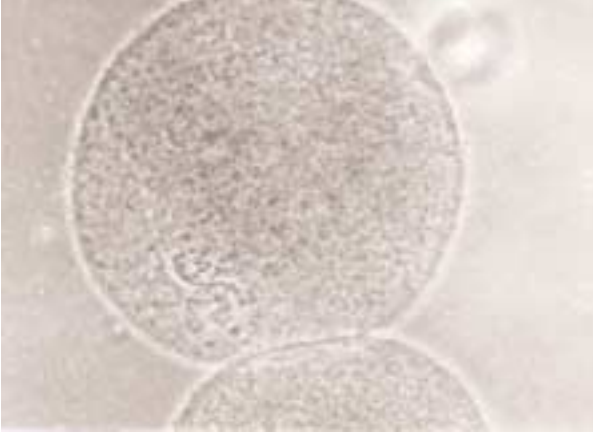
**Spermatozoonların Hipotaurin ile Kapasitasyonu:** Kapasitasyon amacı ile 0,25 µl' lik payette dondurulmuş sperma çözüldükten sonra 200 ml' lik hacimler halinde 0,5 mM hipotaurin (SIGMA, H-1384) içeren 1,5 ml Modify Defined Medium (mDM) solusyonu içine otomatik pipet yardımıyla tabakalandırılarak 45 derecelik eğimle, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli atmosferde, 38.5°C'de 7 saat inkubasyona bırakılmıştır.

**Spermatozoonların Folliküler Sıvı ile Kapasitasyonu:** Boğa spermatozoonlarının kapasitasyonu amacı ile kullanılacak olan folliküler sıvı, yeterli büyüktükteki (çapları 15 mm' den daha büyük) folliküllerden aspirasyon yoluyla elde edilmiştir. Bu sıvı, hücre döküntülerinin elimine edilmesi amacıyla 30 dakika süreyle 3000 devirde santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda tüpün üstünde kalan kısım 0,20 mm' lik filtrelerden geçirilerek kullanıncaya kadar -20°C' de saklanmıştır; kullanımdan önce 56 °C' deki su banyosunda 30 dk tutularak inaktive edilmiştir.

Kapasitasyon amacı ile 0,25 ml'lik payette dondurulmuş sperma çözüldükten sonra 200 µl'lik hacimler halinde %25 follikül sıvısı içeren 1,5 ml mDM solusyonu içine otomatik pipet yardımıyla tabakalandırılarak 45 derecelik eğimle, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli atmosferde, 38.5°C'de 4 saat inkubasyona bırakılmıştır.

Her iki kapasitasyon ortamına da özel inkübatöre konmadan önce 3 mg/ml sığır serum albumini (BSA) ilave edilmiştir. Her iki kapasitasyon yönteminde de swim-up tekniği uygulanarak spermada bulunan motil spermatozoonların elde edilmesi ile birlikte kapasitasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

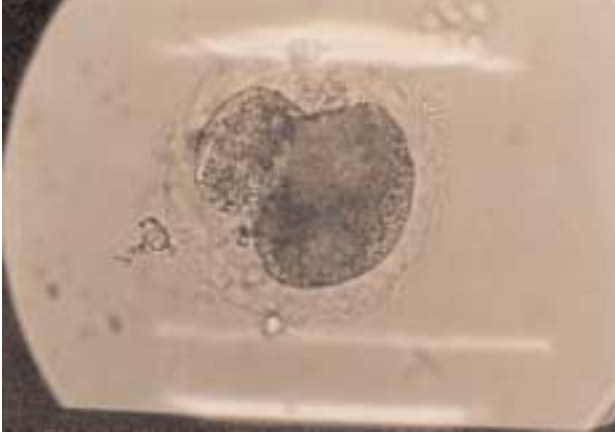
**Oositlerin In Vitro Fertilizasyonu:** Fertilizasyon medium'u olarak kapasitasyon amacıyla mDM solusyonu kullanılmıştır. Oositler 97 µl'lik damlalar halinde hazırlanmış fertilizasyon medium'una aktarıldıktan sonra üzerlerine, sonuç konsantrasyonu 1-3x10<sup>6</sup>/ml olacak şekilde swim-up yöntemi ile hazırlanmış ve kapasitasyona alınmış 3µl sperma katılmıştır. Oosit ve spermatozoonlar fertilizasyon medium'unda, üzerleri mineral yağ ile örtülerek %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli atmosferde, 38,50C'de 18 saat süreyle inkubasyona alınmıştır.İnkubasyon sonunda serumsuz Ham's F-10 içinde kültüre edilerek bölünmeleri izlenmiştir. Ancak, bölünmelerin bloke olması nedeniyle oositler bu 18 saatlik süre sonunda alınarak fikse edilmiş ve pronukleus formasyonları izlenmiştir (Şekil 3-6).



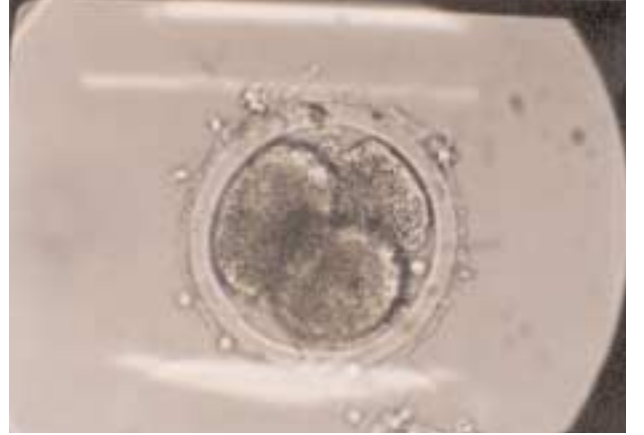
Şekil 3. Fertilizasyon sonrası dişi ve erkek pronukleus formasyonu. (x200).



Şekil 4. Dişi ve erkek pronukleuslarının kaynaşması. (x200).



Şekil 5. İki blastomerli embriyo. (x200).



Şekil 6. Dört blastomerli embriyo. (x200).

İnkubasyon sonunda oositler bir pastör pipeti yardımıyla pipete edilerek kumulus hücrelerinden ayrılmıştır. Daha sonra %0,7'lik KCl içinde bir lam üzerine toplanarak üzeri lamelle kapatılmış (lamelin lama yapışması için eritilmiş 1:1 oranında vazelin-parafin karışımı kullanılmıştır) ve 1:3 oranında asetik asit / etil alkol ortamında 24 saat fiksasyona alınmıştır. Daha sonra lamalar, fiksativden alınarak kurutulmuş ve bir pastör pipeti yardımıyla %1' lik aseto-orcein ile 5 dakika boyanmışlardır. Boyama sonrası hazırlanan preparat pronukleus formasyonlarının gözlenmesi amacıyla bekletilmeden phase-contrast mikroskopta incelemeye alınmıştır.

### Bulgular

Araştırmada, mezbahada kesilen inek ve düvelerden toplam 336 ovaryum toplanmış ve bunlardan normal

görünümlü, kistik yapıda olmayan, normal folliküllere sahip ovaryumlar kullanılmıştır. Seçilen ovaryumlardan toplam 1612 oosit aspire edilmiştir. Bu oositlerden sağlıklı görünümdeki, sitoplazmasında granülleşme olmayan, kompakt yapıda ve en az 3-4 sıra kumulus hücrelerine sahip olan 878 tanesi maturasyon ortamına aktarılmıştır. Maturasyon amacıyla yapılan 24 saatlik inkubasyon sonrasında 385 tanesi, kumulus ekspansiyonu göstererek mature olmuştur. Maturasyon oranı %43,85 olarak saptanmıştır. Mature olan oositlerden 190 tanesi, hipotaurin ile kapasitasyonu indüklenmiş spermatozoa ile fertilizasyona alınmış ve 65 oosit pronukleus formasyonu göstermiştir. Mature olan oositlerden 195 tanesi ise, follikül sıvısı ile kapasitasyonu indüklenmiş spermatozoa ile fertilizasyona alınmış ve 57 oosit pronukleus formasyonu göstermiştir. Buna göre fertilizasyon oranı, hipotaurin ile %34,21, follikül sıvısı ile %29,23 olarak saptanmıştır. Araştırma sonunda elde edilen toplam

fertilizasyon oranı ise %31,72 olmuştur. Yapılan istatistiki değerlendirmede fertilizasyon oranları arasındaki fark  $p<0.01$  düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 1-2).

## Tartışma

İn vitro kapasitasyon yöntemlerinin fertilizasyon oranına etkisini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada toplam 878 adet oosit, olgunlaşma işlemine tabi tutulmuştur. Bunlardan 493 tanesi (%56,15) olgunlaşma döneminde dejenere olmuştur. Kumulus ekspansiyonu geçiren 385 oosit (%43,85) ise, olgunlaşmış oldukları

kabul edilerek fertilizasyona alınmıştır. Maturasyon işleminden sonra oositler iki gruba ayrılarak 1. Grup, hipotaurin ile kapasite edilmiş spermatozoonlarla 2. Grup ise, follikül sıvısı ile kapasite edilmiş spermatozoonlarla in vitro fertilizasyona alınmıştır. Fertilizasyon sonrası 18. saatte yapılan fikzasyon ve boyama işleminden sonra oositlerdeki pronukleus formasyonları ile fertilizasyon değerlendirmesi yapılmıştır. Buna göre fertilizasyon oranları sırasıyla %34,21 ve %29,23 olarak saptanmıştır.

Araştırmada elde edilen maturasyon oranına bakıldığında olgunlaşma aşamasında bir takım problemlerin olabileceği düşünülmektedir. Çünkü, kaynak

Tablo 1. İn vitro fertilizasyon için toplanan, değerlendirilen, mature edilen ve fertilize olan oosit bulguları.

No.	Ovaryum Sayısı (n)	Toplanan Oosit (n)	Değerlendirilen Oosit		Mature olan Oosit		Fertilizasyona Alınan Oosit (n)		Fertilize Olan Oosit			
			(n)	%	(n)	%	Hipotaurine	Follikül Sıvısı	Hipotaurin (n)	%	Follikül Sıvısı (n)	%
1	37	141	60	42,5	19	31,6	10	9	1	10,0	-	-
2	35	126	56	44,4	16	28,5	8	8	-	-	1	12,5
3	30	110	75	68,1	21	28,0	11	10	2	18,1	-	-
4	30	105	50	47,6	9	18,0	4	5	-	-	1	20,0
5	28	106	77	72,6	28	36,3	13	15	2	15,3	6	40,0
6	34	139	49	35,2	22	44,8	12	10	3	25,0	4	40,0
7	42	187	81	43,3	41	50,6	20	21	8	40,0	5	23,8
8	22	105	90	85,7	44	48,8	22	22	10	45,4	8	36,3
9	14	96	76	79,1	35	46,0	15	20	7	46,6	6	30,0
10	12	78	48	61,5	31	64,5	15	16	8	53,3	7	43,7
11	6	60	45	75,0	20	44,4	10	10	4	40,0	3	30,0
12	10	75	40	53,3	14	35,0	7	7	2	28,5	3	42,8
13	10	86	35	40,6	23	65,7	11	12	2	18,2	2	16,6
14	14	102	46	45,0	22	47,8	12	10	5	41,6	2	20,0
15	12	96	50	52,0	40	80,0	20	20	11	55,0	9	45,0
Toplam	336	1612	878	54,4	385	43,8	190	195	65	34,2	57	29,2

Tablo 2. Hipotaurin ve follikül sıvısı ile kapasite edilen dondurulmuş boğa spermatozoonlarından elde edilen fertilizasyon bulguları.

Toplanan Oosit (n)	Değerlendirilen Oosit		Dejenere Olan Oosit		Mature olan Oosit		Fertilizasyona Alınan Oosit (n)		Fertilize Olan Oosit *			
	(n)	%	(n)	%	(n)	%	Hipotaurin	Follikül Sıvısı	Hipotaurin (n)	%	Follikül Sıvısı (n)	%
1612	878	54,46	493	56,15	385	43,85	190	195	65	34,21	57	29,23

\* $p<0.01$

taramalarında son zamanlarda yapılan benzer çalışmalarda (12) maturasyon oranları %70-90 arasında bildirilmektedir. Sonuçların düşük olmasında etkili olan faktörler arasında yöntemin ilk kez uygulanıyor olması ve manuplasyon gücünün düşük düşünülebilir. Nitekim Tablo 1' den de izlenebileceği gibi maturasyon ve fertilizasyon işlemlerinin ilk örneklerinde çok düşük olan fertilizasyon oranları, sonraki örneklerde yükselmektedir.

Araştırmada kullanılan yöntemin benzer araştırmalarda da (18, 28) kullanılması yöntem hatası bulunmadığını ancak, mezbahadan toplanan biyolojik materyalin (ovaryum) kökeninin ve inek materyalinin beslenme koşullarının da bu başarısızlıkta etkin olabileceğini düşündürmüştür. Özellikle kesime giden hayvanların çoğunun infertil olması, araştırmada elde edilen sonuçlara etki etmiş olabilir. Benzer olarak sığır ırklarının IVM ve IVF uygulamalarında etkin olduğunu belirten Armas ve ark. (33) holstein ırkı ile zebu sığırlarını ve bunların F1 melezlerini araştırmalarında kullanmışlar ve sonuç olarak F1 melezlerin transfer edilebilir embriyo elde edilebilmesi için daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmada elde edilen fertilizasyon oranları da, yine olgunlaşma oranlarına paralel olarak oldukça düşük seviyelerde kalmıştır. Oysa ki, benzer hatta bazılarında aynı yöntem kullanılarak yapılmış çalışmalarda (12, 14, 21, 28, 34) bu oranlar yine %60-85 gibi oldukça yüksek seviyelerde bildirilmiştir. Kimi araştırmacılar (21) fertilizasyondaki başarıyı, oositlerin olgunlaşmaları sırasında buldukları ortamın kombinasyonunun etkilediğini bildirirlerken, kimileri de (35) direkt olarak boğa faktörü, fertilizasyon medium'u ve atmosfer yapısı gibi faktörlere bağlamışlardır. Bazı araştırmacılar (36) ise spermatozoa kapasitesinin ve kullanılan yöntemin oosit fertilizasyonunu etkilediğini bildirmişlerdir. Yapılan araştırmada, fertilizasyona alınan oositler, fertilizasyondan sonra bölünmelerinin izlenmesi amacıyla kültüre edilmişlerdir. Ancak, oositlerin pronukleus aşamasından sonraki bölünme aşamalarında bloke olduğu gözlenmiş ve fertilize olan oositlerin büyük bir oranda pronukleus aşamasında kaldıkları, bölünmedikleri saptanmıştır. Bu nedenle oositler fertilizasyon sonrası 18. saatte fikse edilerek, fertilize olan oositlerin tümünün değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda Bavister ve ark. (12) IVF' da en büyük problemin, bölünmelerin bloke olması ve embriyoların morula-blastosist aşamalarına ulaşma oranının %25-40'larda kalması olduğunu bildirmişlerdir. Fertilizasyon oranlarına yine manuplasyon ve ortamın etkisi de gözardı edilmemelidir.

İn vitro olgunlaştırılan oositlerin fertilizasyonu için dondurulmuş ve çözünmüş sperma kullanımı en yaygın olanıdır. Çözünen sperma swim-up, swim-down, glas wool filtrasyon, transmigrasyon gibi yöntemlerle ayrıştırılarak sadece motil olanlar fertilizasyonda kullanılabileceği gibi spermanın ayrıştırılmasında percoll-gradient (37) yönteminden de yararlanılabilmektedir. Spermada motil olanların separasyonu ve kapasitasyon amacıyla, araştırmacılar (21, 38, 39, 40, 41) BSA destekli Tyrode's Lactate (TALP), Modify Defined Medium (mDM), Brackett-Oliphant medium (BO), Biggers-Whitten-Whittingham medium (BWW), Krebs Ringer bikarbonat medium (KRB) ve TEST-yolk gibi mediumlar kullanmışlardır. Ancak, spermatozoonların kapasitasyonu ve fertilizasyon yeteneği kazanabilmeleri için bu medium'lara heparin, hipotaurin, follikül sıvısı, Ca iyonu gibi maddelerin ilave edilmesi gerekmektedir.

Araştırmada, Hipotaurin ile kapasite edilmiş spermatozoonlarda fertilizasyon oranının follikül sıvısına oranla daha yüksek olduğu ancak, inkubasyon süresinin uzunluğunun dezavantaj oluşturduğu gözlenmiştir. Follikül sıvısı ile kapasite edilen spermatozoada ise inkubasyon süresi daha kısa (4 saat) olmasına rağmen fertilizasyon oranı daha düşük saptanmıştır. Ayrıca follikül sıvısının yapışmalara neden olması ve filtrasyon zorluğu hipotaurin'i daha avantajlı hale getirmektedir. Bununla birlikte hipotaurin ve follikül sıvısı birçok araştırmada antioksidan ve kapasitasyon amacıyla, kapasitasyon, maturasyon ve fertilizasyon aşamalarında kullanılmıştır (4, 8, 41, 42).

Ball ve ark. (43) hipotaurin ve epinefrinin fertilizasyon kalitesini artırdığını ( $p < 0.05$ ), oositlerin çoğunda dişi ve erkek pronukleuslarının gözlendiğini ve Ca iyonu ile preinkubasyona gerek olmadığını bildirmişlerdir.

Mc Nutt ve Killian (42) kapasitasyon amacıyla folliküler ve oviduktal sıvı kullandıkları araştırmalarında her iki biyolojik sıvının %20'nin üzerindeki oranlarda, 4 saat içinde kapasitasyonu indüklediklerini bildirmişlerdir. Bunun yanında folliküler sıvının %40'ın üzerinde kullanılması ile akrozom reaksiyonunun gerçekleştiğini saptamışlardır. Iqbal ve Hunter (44) ise spermatozoa hareket özellikleri, hiperaktivasyon ve akrozomal bütünlük yönünden folliküler sıvı ile heparini karşılaştırmışlar ve aralarında bu özellikler yönünden herhangi bir farklılık gözlenmediğini tesbit etmişlerdir.

Sanbuissho ve Threlfall, (17) aynı yöntemi uyguladıkları araştırmalarında farklı olarak oosit maturasyonu amacıyla östrustaki sığır serumu ile desteklenmiş Ham's F-10 kullanmışlar ve mature olan

oositleri follikül sıvısı ile 4 saat kapasite ettikleri spermatozoa ile %33,9 fertilizasyon oranına ulaştıklarını bildirmişlerdir. Bu sonucun, bu araştırmada follikül sıvısı ile elde edilen fertilizasyon oranına yakın olduğu gözlenmektedir. Buna karşılık Utsumi ve ark. (10) hormon, FCS ve pyruvat destekli TCM-199 ile mature ettikleri oositleri 0.05mM hipotaurin ile 6-8 saat kapasite ettikleri spermatozoa ile fertilize etmişler ve maturasyon oranını %91, fertilizasyon oranını % 63 olarak tesbit etmişlerdir. Bu sonuç, bu araştırmada elde edilen fertilizasyon oranına göre oldukça yüksek bulunmuştur. Buna benzer olarak Saeki ve ark. (11) da yaptıkları benzer bir çalışmada %80 fertilizasyon oranı bildirmişlerdir.

Çalışmada elde edilen değerler ile literatür kaynakları arasında şekillenen bu farklılıklar (in vitro maturasyon, kapasitasyon ve fertilizasyon) kullanılan yöntem, çevre koşulları ve laboratuvar ortamı, kullanılan kimyasal ve biyolojik maddelerin farklılığından oluşabileceği gibi, mezbahadan elde edilen biyolojik materyalin farklılığına, bu materyalin kesim öncesi barınma, beslenme ve sağlık koşullarına da bağlanabilir. Bütün bunların yanı sıra çalışmada kullanılan medium (Ham's F-10), hormon (FSH, LH) ve soğukta saklanması gereken maddelerin (BSA) satın alma öncesi depolama koşullarının tam olarak sağlanıp sağlanmadığı da oldukça önemlidir. Çünkü bu maddelerin kullanılabilirliği araştırma sonuçlarını doğrudan etkilemektedir.

Her iki kapasitasyon yöntemiyle spermatozoonların kapasitasyon oranlarının sadece fertilize olan oositlerin oranıyla karşılaştırılması da, dikkate alınması gereken bir

durumdur. Bu nedenle spermatozoa kapasitasyonunu ortaya koyan başka yöntemlerin de denenmesi düşünülmelidir.

Günümüzde hayvan ıslahını hızlandırmak amacı ile biyoteknolojik uygulamalar içinde son yıllarda oldukça büyük gelişme gösteren bu teknik, embriyo transfer çalışmalarındaki vericilere ve süperovulasyon gibi pahalı uygulamalara bağımlılığı ortadan kaldıracak, ayrıca zorunlu kesimler nedeniyle oluşan ekonomik kayıplar, kazanılan embriyolar sayesinde azaltılmış olacaktır. Yöntemin etkinliğinin artırılması ile embriyolar ucuz ve kolay şekilde üretilerek cerrahi olmayan tekniklerle çok sayıda hayvana transfer edilebilecektir. Bunun ötesinde IVM / IVF ile elde edilen embriyolar, nükleer transfer ve gen manüplasyonları için de başlangıç materyali oluşturmaktadır. Bu tür bilimsel çalışmalarda kullanılacak oosit ve embriyo sayısının fazla olması gerektiğinden, bu teknik ile çok sayıda embriyonun bir anda incelenebilmesi sağlanarak bilime de bir zenginlik kazandırılacaktır (45). Genetik ilerleme için büyük bir potansiyel oluşturması, transgenik hayvan üretimi ve bunun sonucunda hastalıklara dirençli sürülerin oluşturulması, embriyo çoğaltılması yoluyla, tek bir embriyodan birden fazla ve yüksek verimli identik yavruların elde edilebilmesi ve bunların transferi için de in vitro embriyo üretimi zorunlu görülmektedir.

Bu amaçla yapılan araştırmada IVM ve IVF' nin önemli bir aşaması olan in vitro spermatozoa kapasitasyonunda değişik kapasitörlerin fertilizasyona etkileri araştırılmış ve hipotaurinin follikül sıvısına oranla daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

## Kaynaklar

1. Muyan, M., Memelilerde fertilizasyon. Doğa Bilim Derg. 1984; 8 (2) 191-208.
2. Gordon, I., Lu, K.H., Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology, 1990; 33, 77-87.
3. Shamsuddin; M., Niwa, K., Larsson, B., Rodriguez-Martinez, H., In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. Reprod. Dom. Anim., 1996; 31, 613-622.
4. Guerin, P., Menezo, Y., Hipotaurin and taurine in gamete and embryo environments. Zygote, 1995; 3 (4): 333-343.
5. Rosenkranz, C., Holzman, A., The influence of semen preparation and culture medium on the success of IVF in cattle. Zentralbl Veterinarmed A, 1995; 42 (2)139-143.
6. Schellander, K., Fuhrer, F., Brackett, B.G., Korb, H., Schleger, R., In-vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with oestrus cow serum. Theriogenology, 1990; 33, 477-485.
7. Boatman, D.E., Bavister, B.D., Cruz, E., Addition of Hipotaurin can reactive immotile goden hamster spermatozoa. J. Androl. 1990; 11 (1): 66-72.
8. McNutt, T.L., Olds-Clarke, P., Way, A.L., Suarez, S.S., Killian, G.J., Effect of follicular or oviductal fluids on movement characteristics of bovine sperm during capacitation in vitro. J. Androl. 1994; 15 (4): 328-336.
9. Iritani, A., Kasai, M., Niwa, K., Song, H.B., Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. J. Reprod. Fertil., 1984; 70 (2): 487-492.



10. Utsumi, K., Kata, H., Iritani, A., Full term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 1991; 35: 695- 703.
11. Saeki, K., Hoshi, M., Leibfried-Lutledge, M.L., First, N.L., In-vitro fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available FSH. *Theriogenology*, 1990; 34(6): 1035-1039.
12. Bavister, B.D., Rose-Hellekant, T.A., Pinyopummintr, T., Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 1992; 37, 127-146.
13. Kato, H., Iritani, A. In vitro fertilization in cattle. *Mol. Reprod. and Dev.* 1993; 36, 229-231.
14. Parrish, J.J., Susko-Pamsh, J.L., Leibried-Lutledge, M-L., Critser, E.S., Eyestone, W., First, L., Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 1986; 25, 591-600.
15. Fukui, Y., Sonoyama, T., Mochizuki, H., Ono, H., Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 1990; 34 (3) 579-591.
16. Aoyagi, Y., Fujii, K., Ivazumi, Y., Furudate, M., Fukui, Y., Ono, H., Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology* 1988; 30 (5) 973-985
17. Sanbuissho, A., Therelfall, W.R., Effects of estrous cow serum on the in-vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology*, 1989; 31, 693-699.
18. Sanbuissho, A., Therelfall, W.R., The influence of serum and gonodotropins on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 1990; 34, 341- 348.
19. Miller, D.J., Hunter, A.G., Effect of osmolality and glycosaminoglicans on motility, capacitation, acrosome reaction and in vitro fertilizability of bovine ejaculated sperm. *J. Dairy Sci.*, 1986; 69 (11): 2915-2924.
20. Wheeler, M.B., Seidel G.E., Capacitation of bovine spermatozoa by lysophospholipids and trypsin. *Gamete Res.*, 1989; 22 (2): 193-204.
21. Brackett, B.G., Zuelke, K.A., Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 1993; 39, 43-64.
22. Niwa, K., Ohgoda, O., Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 1988; 30, 733-741.
23. Birler, S., Papuççuoğlu, S., İleri, K., Alkan, S., Evecen, M., Sığır oositlerinin olgunlaştırılmasında farklı sürelerin etkisi. *Türk Veteriner ve Hayvancılık Derg.* 1997.
24. Papuççuoğlu, S., İleri, K., Tavşan embriolarının in vitro kültüründe sığır serumunun kullanılabilirliği. *İ.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 1991; 17 (2) 39-45.
25. Lu, K.H., Gordon, I., Gallagher, M., McGovern, H., Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.*, 1987; 121: 259-260.
26. Younis, A.I., Bracket, B.G., Fayrer-Hosken, R.A., Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.* 1989; 23, 189-201.
27. Fukushima, M., Fukui, Y., Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 1985; 9: 323-332.
28. Saeki, K., Kato, H., Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K., Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 1991; 35(5), 1051-1058
29. Leibfried, M.L., Critser, E.S., Parrish, J.J., First, N.L., In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 1989; 31: 61-74.
30. Iritani, A., Niwa, K., Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 1977; 50, 583-590.
31. Brackett, B.G., Bousquet, D., Noice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., Dressel, M.A., Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 1982; 27: 147-158.
32. Papuççuoğlu, S., İleri, K., PMSG'nin iki farklı uygulaması ile kazanılan tavşan embriolarının değişik vasatlarda in vitro kültürleri ve transferleri. *TÜBİTAK, Doğa Türk Veteriner ve Hayvancılık Derg.*, 1994; 18 (2) 53-58.
33. Armas, R., Solano, R., Pupo, C.A., Aguilar, A., Aguirre, A., Riego, E., Castro, F.O., Effect of donor oocyte breed on in vitro fertilization results in cattle. *Theriogenology* 1994; 41: 186.
34. Birler, S., Sığır ovumlarının in vitro fertilizasyonu. *Hayv. Araştırma Derg.*, 1994; 4 (2): 82-84.
35. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Wine, M.A., First, N.L., Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 1988; 38, 1171-1180.
36. Chang, M.C., The meaning of sperm capacitation. A historical perspective. *J. Androl.* 1984; 5 (2): 45-50.
37. Trounson, A., The production of ruminant embryos in vitro. *Animal Reproduction Science*, 1992; 28, 125-137.
38. Handrow, R.R., First, N.L., Parrish, J.J. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J. Exp. Zool.* 1989; 252, 174-182.
39. İjaz, A., Hunter, A.G., Induction of bovine sperm capacitaion by TEST - Yolk semen Extender. *J. Dairy Sci.*, 1992; 72: 2683-2690
40. Park, C.K., Ohgoda, O., Niwa, K., Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J. Reprod. Fert.*, 1989; 86, 577-582.

41. Bondioli, K.R., Wright, R.W., In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated in vitro. *J. Anim. Sci.*, 1983; 57 (4): 1001-1005.
42. McNutt, T.L., Killian, G.J., Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J. Androl.*, 1991; 12 (4): 244-252.
43. Ball, G.D., Leibfried, M.L., Lenz, R.W., Ax, R.L., Bavister, B.D., First, N.L., Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reprod.* 1983; Vol 28, 717-725
44. Iqbal, N., Hunter, A.G., Effect of various capacitation systems on bovine sperm motion characteristics, acrosome integrity, and induction of hyperactivation. *J. Dairy Sci.*, 1995; 78 (1): 91-102
45. Birler, S., Papuççuoğlu, S., İleri, K., Alkan, S., Biyoteknolojik yöntemlerin reproduktif çalışmalar ve hayvan ıslahındaki yeri. *Hasad*, 1995; 124, 44-47.