Turk J Vet Anim Sci
27 (2003) 1409-1412

Araştırma Makalesi

Kedi Oositlerinin in vitro Olgunlaştırılması Üzerine Çalışmalar

Mithat EVECEN, Hatem ATALLA, Sema BİRLER, Alper BARAN, Kemal AK
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, 34320, Avcılar, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 19.08.2002

Özet: Çalışmada kedi oositlerinin in vitro olgunlaştırılması üzerine, gonadotropin ve Bovine Serum Albumin (BSA) katkılı Sentetik Ovidukt Sıvısı (SOS) ve Ham's F-10 medyumlarının etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Araştırmanın materyalini, kısırlaştırmak amacıyla ovaryo-histerktomi edilen 18 sokak kedisinin ovaryumlarından kazanılan 416 oosit oluşturdu. Ovaryumlar iki saatlik süre içerisinde + 38 ºC'deki PBS solüsyonu içerisinde laboratuara taşındı. Kazanılan oositler iki grup halinde (1. Grup: SOS + % 0,4 BSA + 10 µg/ml FSH + 10 µg/ml LH, 2. Grup: Ham's F-10 + % 0,4 BSA + 10 µg/ml FSH + 10 µg/ml LH), gaz karışımı (% 5 O_2, % 5 CO_2, % 90 N_2) ve % 100'e yakın nem'in sağlandığı 38,5 ºC'lik inkübatör ortamında 48 saat süre ile olgunlaşmaya bırakıldı. Bu sürecin sonunda, oositler fikse edildi ve boyandı. Faz-kontrast mikroskopta x400 büyütmede olgunlaşma durumları saptandı. Veriler Student -t testi yöntemiyle karşılaştırıldı ve önemlilik kontrolü gerçekleştirildi. SOS medyum grubunda 209 ve Ham's F-10 medyum grubunda 207 adet olmak üzere toplam 416 adet oosit kullanıldı. SOS grubundaki oositlerin % 54,06 (113/209)'sının, Ham's F-10 grubundaki oositlerin ise % 29,00 (60/207)'unun M II aşamasına geliştiği ve bu değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($P < 0,001$). Sonuç olarak, kedi oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında SOS medyumunun Ham's F-10 medyumundan daha başarılı olduğu ve bu sonuçlar çerçevesinde kedi in vitro fertilizasyonu çalışmaları için yeterli bir altyapı sağlandığı söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Kedi, oosit, in vitro olgunlaşma, medyum

Studies on the in vitro Maturation of Cat Oocytes

Abstract: The aim of the present study was to investigate the effects of gonadotrophin and Bovine Serum Albumin (BSA) supplemented Synthetic Oviduct Fluid (SOF) and Ham's F-10 media on the in vitro maturation of cat oocytes. Oocytes collected from spayed stray queens served as the material of the study. The ovaries were brought to the laboratory within 2 h in PBS solution at 38 °C. Recovered oocytes were divided into two groups (Group 1: SOF + 0,4% BSA + 10 µg/ml FSH + 10 µg/ml LH, group 2: Ham's F-10 + 0,4% BSA + 10 µg/ml FSH + 10 µg/ml LH) and left for maturation in an incubator at 38.5 °C for 48 h under atmosphere containing 5% O_2, 5% CO_2 and 90 % N_2 and almost 100% humidity. Oocytes were then fixed and stained. The maturation status of the oocytes was evaluated under a phase-contrast microscope at x400 magnification. Data were compared by using Student's t-test. Group 1 had 209 oocytes and group 2 had 207: a total of 416. In group 1 54.06% (113/209) and in group 2 29.00% (60/207) of the oocytes reached the M II stage. The difference between these values was statistically significant. At the end of the study, it was concluded that SOF medium was superior to Ham's F-10 medium for the in vitro maturation of cat oocytes. These results also showed that a satisfactory background for in vitro fertilization studies of cat oocytes has been established.

Key Words: Cat, oocyte, in vitro maturation, medium

Giriş

Günümüzde dünya üzerinde yaşayan ve doğal yaşam alanları hızla yok olan 36 vahşi kedi türünün büyük çoğunluğu (1,2) ve ülkemize özgü olan Van ve Ankara kedilerinin nesli yok olma tehdidi altındadır.

İn vitro Maturasyon (IVM), İn Vitro Fertilizasyon (IVF) ve Embriyo Transferi (ET) gibi biyoteknolojik yöntemler, çiftlik hayvanlarında daha çok verim artışına yönelik ıslah programları amacıyla kullanılırken (3-5), bu tip çalışmalar son yıllarda, nesli tükenme tehdidi altındaki vahşi kedigillere iyi bir model olan evcil kediler üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır (6-11).

Kedi oositlerinin in vitro olgunlaştırılması amacıyla yapılan çalışmalardan oldukça değişik sonuçlar alınmaktadır (% 2- % 82). Olgunlaştırma sonuçlarının bu kadar değişken olmasında, kullanılan vericilerin beslenme durumları (12), içinde bulundukları siklus dönemi (13,14), kazanılan oositlerin kalitesi (10), medyuma katılan protein (11) ve hormonların tip ve miktarları (15,16) gibi faktörlerin yanı sıra, kullanılan medyum tipi de önemli derecede (6) rol oynamaktadır. Bu amaçla araştırıcılar, çalışmalarında birçok farklı medyum denemiş ve değişik sonuçlar elde etmişlerdir (6,11,13-17).

Bu çalışmaların yeni olması ve henüz istenilen düzeyde başarılı sonuçların alınamaması, bu konudaki çalışmalara daha fazla eğilmek gerekliliğini doğurmaktadır.

Sunulan çalışmada, kedi oositlerinin in vitro olgunlaştırılması üzerine gonadotropin ve BSA katkılı SOS ve Ham's F-10 medyumlarının etkisi araştırıldı.

Materyal ve Metot

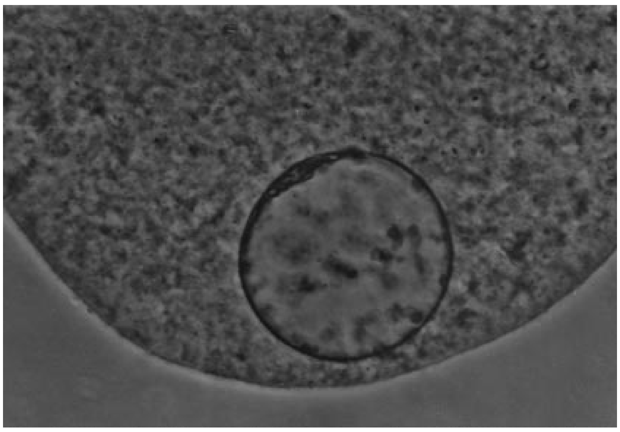
Kısırlaştırmak maksadıyla ovario-histerektomi yapılmış sokak kedilerinden alınan ovaryumlar, 38 °C'deki PBS solüsyonu içerisinde ve 2 saatlik sürede laboratuara getirildi. Ovaryumların yüzeyine bisturi yardımıyla kesitler atıldıktan sonra (Slicing) 38 ºC'deki M 2 medyumu yardımıyla yıkanarak yıkantı sıvısı saat camına toplandı. İn vitro olgunlaştırma için ayrılacak oositlerin seçiminde; sağlam bir zona pellusida, kompakt kumulus ooforus/korona radiata yapısı, homojen ve zona içini dolduran vitellus varlığı kriterleri göz önünde tutuldu (2,6). Oositler yıkama medyumunda 3 kere pasajlandıktan sonra, hangi medyumda olgunlaşmaya alınacaklarsa o medyumdan hazırlanmış damlalar içerisinde 3 kere pasajlandılar.

Seçilen oositler, en az 1 saat öncesinden 500 µl hacimlerde üzeri mineral yağ ile örtülü olarak hazırlanmış ve 38 °C'lik sıcaklık ve % 5 CO_2, % 5 O_2, % 90 N_2 gaz karışımlı inkübatör ortamında gazlanmış olan 1. Grup: sentetik ovidukt sıvısı (SOS) medyumu + % 0,4 BSA + 10 µg/ml FSH (Sigma F-2293) + 10 µg/ml LH (Sigma L-5269), (pH: 7,9; Ozmolarite: 286 mOsm) ve 2. Grup: Ham's F-10 + % 0,4 BSA + 0,23 mM Na Pyruvate (Sigma, P5280) + 10 µg/ml FSH + 10 µg/ml LH, (pH: 7,3; Ozmolarite: 286 mOsm) medyumlarında ve yine aynı koşullarda 48 saat süre ile olgunlaşmaya bırakıldı. Her bir 500 µl'lik medyuma 10-20 adet oosit konuldu. Olgunlaşma süresinin sonunda, oositlerin kumulus hücreleri % 0,1'lik hyaluronidaz enzimi (Sigma H 3506 From Bovine Testes) yardımıyla uzaklaştırıldı ve % 0,7'lik KCl solüsyonunda 2-3 dakika bekletildikten sonra lam-lamel arasına alınan oositler boyama öncesi 1:3 asetik asit-etanol solüsyonu içerisinde 24 saat fikse edilerek, % 2'lik aseto-orsein ile boyandıktan sonra kromatin ve kromozom yapıları faz-kontrast mikroskopta gözlenmek suretiyle olgunlaşma kriterleri belirlendi. Bu kriterler çerçevesinde Metafaz II (M II)'nin yanı sıra, Germinal Vezikül (GV), Diakinez (Diak.), Metafaz I (M I), Dejenere Oosit (Dej.) ve Undetermined Nuclear Material (UDNM) oranları da incelendi.

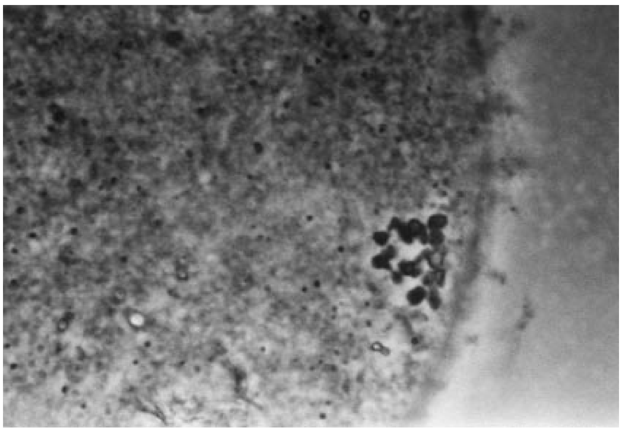
İstatistiksel açıdan gruplar arasındaki medyumun etkileri Student-t testi kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular

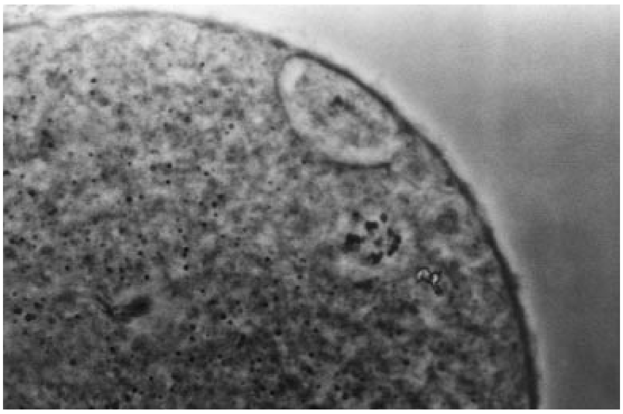
Çalışma süresince 11 kez tekrarlanan çalışmada, 18 adet kediden toplam 416 adet kullanılabilir kalitede oosit toplandı. Oositlerin olgunlaştırıldığı SOS medyum grubunda (n = 209), 26 oosit (% 12,44) germinal vezikül (GV) döneminde (Şekil 1) kalırken, 25 oosit (% 11,97) Diakinez, 41 oosit (% 19,61) M I (Şekil 2), 113 oosit ise (% 54,06) M II (Şekil 3) dönemine ulaştı. Bu gruptaki oositlerin 3'ünün (% 1,43) gelişemeyerek dejenere olduğu belirlenirken, 1'inin de (UDNM= Undetermined Nuclear Material : Belirlenemeyen Çekirdek



Şekil 1. Germinal Vezikül (GV) Döneminde Bir Oosit. x200 Büyütme.



Şekil 2. Metafaz I (M I) Döneminde Bir Oosit. x400 Büyütme.



Şekil 3. Metafaz II (M II) Döneminde Bir Oosit. x400 Büyütme

Materyali) (% 0,48) içerisinde herhangi bir kromozom yapısına rastlanamadı.

Ham's F-10 grubundaki (n = 207) GV, Diak., M I, M II, Dej. ve UDNM oosit sayıları ise sırasıyla; 63 (% 30,43), 38 (% 18,36), 28 (% 13,53), 60 (% 29,00), 15 (% 7,25) ve 3 (% 1,45) olarak gözlendi (Tablo 1).

Son olgunlaşma aşaması olan Metafaz II'ye gelişen oosit oranları yönünden gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda, SOS medyumu grubundaki oositlerin (% 54,06), Ham's F-10 medyumundakilere (% 29,00) nazaran istatistiksel olarak önem teşkil edecek şekilde yüksek olduğu saptandı (P < 0,001).

Çalışmada 48 saatlik olgunlaşma süresinin sonunda SOS ve Ham's F-10 gruplarda sırasıyla 179 (% 85,65) ve 126 (% 60,87) oositin mayoza devam ettiği (Diakinez + MI + M II) gözlendi (Tablo 2). Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada SOS grubundaki oranın, Ham's F-10 grubundakine nazaran istatistiksel olarak önem teşkil edecek şekilde yüksek olduğu saptandı (P < 0,001).

Tablo 2. 48 Saatlik İn Vitro Olgunlaştırma Sonrasında Mayoz Aktivasyonu.

Medyum Grupları	Mayoza Devam Edenler (Diak. + M I + M II) (%)
SOS n = 209	179 (85,65)[a]
Ham's F-10 n = 207	126 (60,87)[b]

[a,b]: Değişik harf taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir. (P < 0.001)
Diak.: Diakinez, M I: Metafaz I, M II: Metafaz II

Tartışma

Kedilerden in vitro embriyo eldesi ve bunların transfer edilebilir aşamalara kadar geliştirilebilmesi, in vitro olgunlaştırma sonuçlarının başarısıyla yakından ilgilidir (2,13,14). İki farklı kültür medyumunun kullanıldığı bu çalışmada, mayoz aktivasyonu gösteren oositler (Diak. + M I + M II) yönünden yapılan karşılaştırmada, SOS medyumunun (% 85,65), Ham's F-10 medyumuna (60,87) oranla daha başarılı olduğu görüldü (P < 0,001). Son olgunlaşma aşaması olan M II'ye ulaşma açısından da SOS medyumunun (% 54,06), Ham's F-10 medyumuna nazaran (% 29,00) çok daha başarılı olduğu saptandı (P < 0,001). SOS grubunda elde edilen M II oranı (% 54,06), çalışmalarında Minimum Essential Medium kullanan Wood ve ark. (11)'nın değerlerine (% 35-66) yakın olurken, TCM 199 medyumu kullanan Pope ve ark. (9)'nın % 38-44 ve Evecen ve ark. (15)'nın % 2'lik bulgularından ise oldukça yüksek bulundu. Buradaki farkların, kullanılan medyumların tipinden kaynaklanmış olabileceği kanısına varıldı.

Tablo 1. Kedi Oositlerinin 48 Saatlik İn Vitro Olgunlaştırma Sonunda Ulaştıkları Gelişim Düzeyleri.

Gruplar	n	GV n (%)	Diek. n (%)	M I n (%)	M II n (%)	Dej. n (%)	UDNM n (%)
SOS	209	26 (12,44) [b]	25 (11,97)	41 (19,61)	113 (54,06) [a]	3 (1,43) [b]	1 (0,48)
Ham's F-10	207	63 (30,43) [a]	38 (18,36)	28 (13,53)	60 (29,00) [b]	15 (7,25) [a]	3 (1,45)

[a,b]: dikey kolonlarda değişik harf taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir (P < 0.001).

GV: Germinal Vezikül, Diak.: Diakinez, M I: Metafaz I, M II: Metafaz II
UDNM: Undetermined Nuclear Material (Belirlenemeyen Çekirdek Materyali), Dej.: Dejenere.

Bir çok memeli türünde, beslenmenin reprodüktif fonksiyonlar üzerinde etkili bir faktör olduğu bilinmektedir (15). Çalışmalarında SOS medyumu kullanan Bogliolo ve ark. (6)'nın yaptıkları in vitro olgunlaştırma çalışmalarında ulaştıkları % 82'lik M II değeri, bulgularımızla karşılaştırıldığında oldukça üstün görünmektedir. Aradaki bu fark, sunulan çalışmada kullanılan kedilerin iyi beslenemeyen sokak kedilerinden oluşmasının bir sonucu olabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, kedi oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında SOS medyumunun kullanılmasının olgunlaşma sonuçları açısından Ham's F-10 medyumundan daha iyi sonuç verdiği görüldü. Elde edilen % 54,06'lık olgunlaşma oranının in vitro fertilizasyon çalışmalarına başlamak için yeterli olduğu ancak, sonuçların daha da artırılması amacıyla, ovaryum vericisi kedilerin ideal beslenme koşullarında beslenmiş olan ev kedilerinden seçilmesinin daha iyi sonuçlar verebileceği söylenebilir.

Kaynaklar

1. Goodrowe, K.L., Hay, M., King, W.A.: Nuclear Maturation of Domestic Cat Ovarian Oocytes in vitro. Biol. Reprod., 1991; 45: 466-470.
2. Pope, C.E.: Embryo Technology in Conservation Efforts for Endangered Felids. Theriogenology, 2000; 53: 163-174.
3. Birler, S., Pabucçuoğlu, S., Ak, K., Alkan, S., Evecen, M., Öztürkler, Y., İleri, İ.K.: Effects of Serum and Hormone Additions to Maturation Medium on in Vitro Maturation of Sheep Oocytes. İstanbul Univ. Vet. Fak. Derg. 1999; 25: 75-79.
4. De Witt, A.A., Wurth, Y.A., Kruip T.A.: Effect of Ovarian Phase and Follicle Quality on Morphology and Developmental Capacity of the Bovine Cumulus-Oocyte Complex. J. Anim. Sci., 2000; 78: 1277-1283.
5. Pabucçuoğlu, S.: The Effects of Hepes and Hormones on in Vitro Maturation of Cattle Oocytes. İstanbul Univ. Vet. Fak. Derg. 2001; 27: 659-670.
6. Bogliolo, L., Leoni, G., Ledda, S., Naitana, S., Zedda, M., Carluccio, A., Pau, S.: Intracytoplasmic Sperm Injection of in vitro Matured Oocytes of Domestic Cats with Frozen–Thawed Epididymal Spermatozoa. Theriogenology, 2001; 56: 955-967.
7. Goodrowe, K.L: Feline Reproduction and Artificial Breeding Technologies. Anim. Reprod. Sci., 1992; 28: 389-397
8. Lengwinat, T., Pitra C.H., Blottner S.: Follicular Immature Oocytes of Domestic Cat: Their Fertilization and Developmental Competence During Co-Culture of Feline Oviductal Epithelial Cells. Theriogenology, 1992; 4: 1793-1796.
9. Pope, C.E., Johnson, C.A., Mcrae, M.A., Keller, G.L., Dresser, B.L.: Development of Embryos Produced by Intracytoplasmic Sperm Injection of Cat Oocytes. Anim. Reprod. Sci., 1998; 53: 221-236.
10. Pope, C.E., Mcrae, M.A., Plair, B.L., Keller, G.L., Dresser, B.L.: In Vitro and in Vivo Development of Embryos Produced by in Vitro Maturation and in Vitro Fertilization of Cat Oocytes. J. Reprod. Fert., 1997; 51: 69-82.
11. Wood, T.C., Byers, A.P., Jennette, B.D., Wildt, D.E.: Influence of Protein and Hormone Supplementation on in Vitro Maturation and Fertilization of Domestic Cat Eggs. J. Reprod. Fert., 1995; 104: 315-323.
12. Robinson, J.J.: Nutrition and Reproduction. Anim. Reprod. Sci., 1996; 42: 25-34.
13. Freistedt, P., Stojkovic, M., Wolf, E.: Efficient in Vitro Production of Cat Embryos in Modified Synthetic Oviduct Fluid Medium: Effects of Season and Ovarian Status. Biol. Reprod., 2001; 65: 9-13.
14. Johnston, L.A., Donoghue, A.M., O'brien, S.J., Wildt, D.E: Influence of Temperature and Gas Atmosphere on in Vitro Fertilization and Embryo Development in Domestic Cats. J. Reprod. Fert., 1991; 92: 377-382.
15. Evecen, M., Baran, A., Tek, Ç.: The Effects of Gonadotrophins on in Vitro Maturation of Cat Oocytes. Turk J. Vet. Anim. Sci., 2002; 26: 1315-1320.
16. Schramm, R.D., Bavister, B.D.: Effects of Gonadotrophins, Growth Hormone and Prolactin in Developmental Competence of Domestic Cat Oocytes Matured in Vitro. Reprod. Fertil. Dev., 1995; 7: 1061-1066.
17. Johnston, L.A., O'Brien, S.J., Wildt, D.E.: in Vitro Maturation and Fertilization of Domestic Cat Follicular Oocytes. Gam. Res., 1989; 24: 343-356.