

KEDİ OOSİTLERİNİN *İN VİTRO* FERTİLİZASYONU

Mithat EVECEN* B. Evrim ŞAHİN* Alper BARAN* Kemal AK*
İ. Kamuran İLERİ*

In Vitro Fertilization of Cat Oocytes

Summary: The aim of the study was to investigate the ability of *in vitro* matured cat oocytes to be fertilized *in vitro* and reach to morula and blastocyst stages *in vitro*. The oocytes collected from spayed stray queens served as the material of the study. The ovaries were brought to the laboratory within two hours in PBS solution at 38°C. Recovered oocytes were left for maturation in SOF medium (%0,4 BSA+10µg/ml FSH + 10µg/ml LH added) in an incubator at 38.5°C for 48 hours under gas mixture (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) and almost 100% humidity. After IVM for 48 h oocytes were co-incubated with frozen-thawed spermatozoa for 20 h, which were capacitated by Swim-Up procedure under the same conditions. After *in vitro* culture for seven days, oocytes/embryos were then fixed and stained. Developmental status of the oocytes/embryos were evaluated under a phase-contrast microscope at x400 magnification. Totally 106 primer oocytes were used for *in vitro* maturation. After 24 h *in vitro* fertilization period, 21 oocytes were cleaved (19.81%). At the end of culture period, 13 (12.16%) and eight (7.54%) of embryos reached to morula and blastocyst stages respectively. In spite of the low cleavage rate, all of the cleaved embryos have reached the morula – blasocyst stage (21/21). As a result of this study, it was observed that transferable embryos could be produced by *in vitro* maturation, fertilization and culture of cat oocytes in SOF medium.

Key Words: Cat, Oocyte, *In Vitro* Fertilization, Embryo

Özet: Çalışmada *in vitro* olgunlaştırılmış kedi oositlerinin *in vitro* fertilize olabile ve akabinde *in vitro* kültür ortamında morula ve blastosist dönemine ulaşabilme kabiliyetlerinin araştırılması amaçlandı. Araştırmanın materyalini, kısırlaştırılmış sokak kedilerinin ovaryumlarından kazanılan oositler oluşturdu. Ovaryumlar iki saatlik süre içerisinde 38°C'deki PBS solüsyonu içerisinde laboratuara taşındı. SOF medyumu içerisinde (%0,4 BSA+10µg/ml FSH + 10µg/ml LH), gaz karışımı (%5 O₂, %5 CO₂, %90 N₂) ve %100'e yakın nemin sağlandığı 38.5°C'lik inkübatör ortamında 48 saat süre ile olgunlaşmaya bırakıldı (IVM). Ardından, Swim-Up yöntemiyle kapasite edilen donmuş kedi spermasıyla 20 saat *in vitro* fertilizasyona bırakıldı (IVF). *In vitro* olarak yedi gün süreyle kültüre edilen oosit/embriyolar fikse edildi ve boyandı. Faz-kontrast mikroskopta x400 büyütmede gelişim durumları saptandı. Çalışmada toplam 106 adet primer oosit kullanıldı. *In vitro* olgunlaştırılan bu oositlerde, *in vitro* fertilizasyonu takip eden 24 saatlik dilimde 21 adet oositin yarıklandığı gözlemlendi. Böylece cleavage oranı, %19.81 olarak belirlendi. Kültür periyodunun sonunda, embriyoların 13 tanesinin (%12.26) morulaya ve sekizinin (%7.54) blastosiste ulaştığı saptandı. Yarıklanma sonuçlarının düşük kalmış olmasına rağmen, çalışmada yarıklanma gözlenen oositlerin tamamının (21/21) morula-blastosiste geliştiği belirlendi. Sonuç olarak, kedi oositlerinin SOF medyumu içerisinde *in vitro* olgunlaştırılması, fertilizasyonu ve kültürünü takiben transfer edilebilir düzeyde embriyo elde edilebildiği görüldü. Sunulan bu çalışma ile ülkemizde ilk defa kedi oositlerinin IVM ve IVF'u ile morula ve blastosist düzeyinde embriyolar elde edilmiş oldu.

Anahtar Kelimeler: Kedi, Oosit, *In Vitro* Fertilizasyon, Embriyo

*: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'î Tohumlama Anabilim Dalı 34320 Avcılar, İSTANBUL.

Giriş

Dünya üzerinde yaşayan 36 vahşi kedi türünün neredeyse tamamı ve evcil kedilerden özellikle ülkemize özgü olan, Van ve Ankara kedilerinin nesilleri yok olma tehlikesi ile karşı karşıya bulunmaktadır (4, 8). Nesli tükenmekte olan bu türlerin korunması ve kontrollü üretimleri için, *In Vitro* Maturasyon (IVM), *In Vitro* Fertilizasyon (IVF) ve Embriyo Transferi (ET) gibi yardımcı üreme teknikleri, son yıllarda evcil ve vahşi kediler üzerinde uygulanmaktadır (1-3, 9, 11). Bu tekniklerle, yaşlılık ve hastalık gibi nedenlerle reproduktif fonksiyonlarını yitirmiş ve hatta ölüm anındaki kedilerden bile *in vitro* koşullarda embriyo üreterek neslin devamını sağlamak mümkün olabilmektedir. Kedi oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılması ve *in vitro* fertilizasyonuna yönelik çalışmalar dünyada 20 yıllık geçmişe sahip olmakla birlikte (1, 6, 8, 10, 13), ülkemizde bu konu çok yakın zamanda gündeme gelmiş ve sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır (2).

Sunulan çalışmada, kısırlaştırılmış sokak kedilerinin ovaryumlarından kazanılan oositlerin *in vitro* olgunlaştırılması ve ardından *in vitro* fertilizasyonu yoluyla embriyo elde edilmesi ve elde edilen embriyoların morula ve blastosist aşamasına kadar geliştirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Oositlerin Kazanılması ve Olgunlaştırılması:

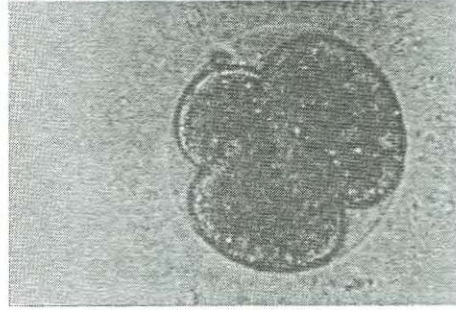
Ovaryumlar, ovario-histektomi yapılmış sokak kedilerinden kazanıldı ve 38°C'deki PBS solüsyonunda 2 saat içerisinde laboratuara taşındı. Ovaryumların yüzeyine bisturi yardımıyla atılan kesitler, 38°C'deki M 2 medyumu yardımıyla yıkanarak oositler saat camına toplandı. *In vitro* olgunlaştırma için ayrılacak oositlerin seçiminde; sağlam bir zona pellusida, kompakt kumulus ooforus/korona radiata yapısı, homojen ve zona içini dolduran koyu renkli vitellus varlığı kriterleri göz önünde tutuldu (1, 2). Seçilen oositler, en az bir saat öncesinden 350 µl hacminde üzeri mineral yağ ile örtülü olarak hazırlanmış ve 38°C'lik sıcaklık ve %5 CO₂, %5 O₂, % 90 N₂ gaz karışımı inkübatör ortamında gazlanmış olan, SOF (Sentetik Ovidukt Fluid Medyumu)+4mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin)+10 µg/ml FSH (Sigma F-2293) + 10 µg/ml LH (Sigma L-5269) (pH: 7.9; Osmolarite: 286 mOsmol) ile 48 saat olgunlaşmaya bırakıldı. Her bir 350 µl'lik medyuma 10-20 adet oosit konuldu.

Spermanın Kapasitasyonu:

Çalışmada IVF amacıyla dondurulmuş kedi sperması kullanıldı. 37°C'de 30 sn.de eritiler sperma 1:1 oranında SOF medyumu ile sulandırıldı ve bu karışım, 300 g'de (550 rpm) seki dakika süreyle santrifüje edildi. Bu işlemin ardından üst kısımda kalan sıvı atıldı ve alttak spermatozoon tortusu üzerine aynı medyumdan 150 µl eklendi. Daha sonra sperma, od sıcaklığında (22°C) bir saat süreyle kapasitasyona (Swim - Up) bırakıldı. Bu sürenin sonunda, medyumun üst kısmı (yüzen spermatozoonlar) toplandı ve spermanın motilitesi ilk konsantrasyonu belirlendi ve sperma aynı medyum ile 2x10⁶/ml olacak şekilde sulandırıldı. En az %40 motil olan spermalar çalışmada kullanıldı (1, 7).

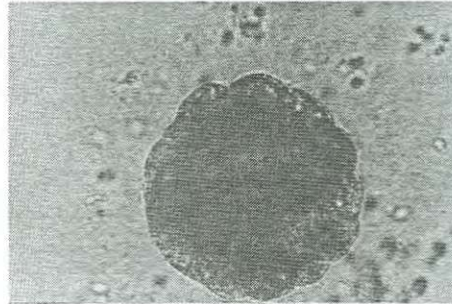
***In Vitro* Fertilizasyon-*In Vitro* Kültür (IVF-IVK):**

Hazırlanmış olan sperma örneğinden 10 µl (20.000.000 spermatozoon) alınarak 90 µl hacmindeki SOF medyum damlaları içinde bulunan 10-20 adetlik oosit gruplarının yanına bırakıldı. Yirmi saat süreyle IVF'a bırakılan oositler daha sonra kültür medyumuna alındı. Medyumlar kültürün üçüncü ve beşinci günlerinde tazelenerek yedi gün süreyle *in vitro* kültüre devam edildi (5, 7). Bu sürenin sonunda, embriyoların kalan kumulus hücreleri %0.1'lik hyaluronidaz enzimi (Sigma H 3506 From Bovine Testes) ve pipetleme yardımıyla uzaklaştırıldı. Ardından, %0.7'lik KCl solüsyonunda iki-üç dakika bekletildikten sonra lam-lamel arasına alınan embriyolar, boyama öncesi 1:3 asetik asit-etanol solüsyonu içerisinde 24 saat fikse edildi. Fiksasyon sonrası, hücre çekirdek boyası %2'lik aseto-orsein ile boyanan oosit/embriyoların gelişim durumları faz-kontrast mikroskopta x400'lük büyütmede belirlendi (2, 4).



Şekil 1. Dört hücreli dönemde bir embriyo (x40)
Picture 1. A Four-celled embryo (x40)

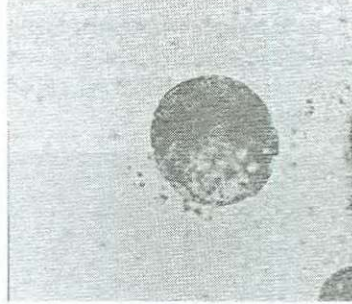
Çalışmanın sonunda, morula ve blastosist aşamasına gelişen embriyoların yanı sıra kültür ortamında gelişemeyerek dejenere olan oosit/embriyoların oranları da belirlendi.



Şekil 2. Morula aşamasına gelişmiş bir embriyo (x40)
Picture 2. An Embriyo at morula stage (x40)

Bulgular

5 defa tekrarlanan çalışmada, yedi adet dişi kediden toplam, 106 adet iyi kalitede oosit toplandı. Oositlerin olgunlaştırıldığı ve ardından fertilize edildiği SOF medyumunda *in vitro* kültürün ilk 24 saatlik diliminde 21 adet oositin yarıklandığı gözlemlendi (Şekil 1). Böylece cleavage oranı %19.81 olarak belirlendi. Bununla birlikte, yedi gün süren *in vitro* kültürün sonunda, embriyoların 13'ünün (%12.26) morulaya (Şekil 2) ve sekizinin (%7.54) blastosiste ulaştığı saptandı (Şekil 3-4) (Tablo 1).

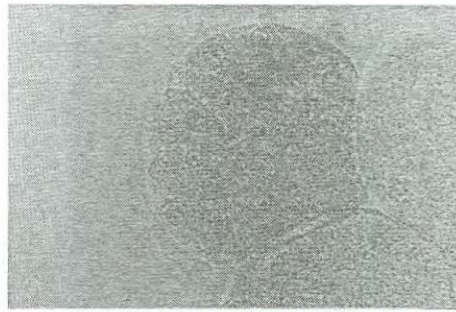


Şekil 3. Blastosist dönemine gelişmiş bir embriyo(x20)
Picture 3. An Embriyo at blasocyst stage (x20)

Tablo 1. İn Vitro fertilizasyonla edilen embriyoların gelişme durumları
Table 1. Developmental stages of embryos derived by *in vitro* fertilization

Oosit Sayısı (n)	Yarıklanan Embriyo Sayısı (%)*	Embriyo Sayısı	
		Morula (%)*	Blastosist (%)*
106	21 (19.81)	13 (12.26)	8 (7.54)

* Oranlar başlangıç oosit sayısı esas alınarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. Boyanmış bir blastosist (x40)
Picture 4. A stained blasocyst (x40)

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada yarıklanma oranı %19.81 olarak gerçekleşti. Johnston ve ark. (5), programlı ısı ve ışık koşullarında barındırdıkları kedilere süperovulasyon uygulayarak kazandıkları sekonder oositlerde %79'luk bir yarıklanma oranı bulduklarını bildirmişlerdir. Buradaki farkın, araştırmacıların bu amaçla *in vivo* olgunlaşmış oositler (sekonder) kullanmaları, sunulan çalışmada ise olgun olmayan (primer) oositlerin *in vitro* ortamda olgunlaştırdıktan sonra kullanılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada elde edilen yarıklanma ve morula+blastosist oranları (%19.81-%19.81) benzer bir çalışmada Lengwinat ve ark. (6)'nın buldukları %35 IVF, ve %30 morula+blastosist değerlerinden daha düşük olarak gerçekleşmiştir.

Bunun yanı sıra, sunulan çalışmadaki yarıklanma (%19.81), morula (%12.26) ve blastosist (%7.54) oranları Pope ve ark. (10)'nın benzer bir çalışmada elde ettikleri IVF (%54), morula (%51) ve blastosist (%31) değerlerinden de daha düşük bulunmuştur.

Bir çok memeli türünde, beslenmenin reproduktif fonksiyonlar üzerinde oldukça etkili bir faktör olduğu bildirilmektedir (12). Sunulan çalışmada özellikle yarıklanma oranlarının düşük kalmasına neden olarak, kullanılan ovaryum vericisi kedilerin tamamının beslenme sorunu yaşayan sokak kedilerinden oluşması beslenme yetersizliğine bağlı muhtemel endokrin yetersizlikler ve bunun kazanılan oositlerin olgunlaşma kabiliyetine olan olumsuz etkileri akla gelmektedir. Çalışmadaki en dikkat çekici yan ise, fertilize olmuş oositlerin tamamının, *in vitro* kültür periyodunu takiben morula ya da blastosiste gelişmeleridir. Bu da kültür medyumunu olarak kullanılan SOF medyumunu ve 38°C sıcaklıktaki gaz karışımı (%5CO₂, %5O₂, %90 N₂) kültür ortamının, *in vitro* fertilize olmuş kedi embriyolarının kültürü için optimal olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, aynı medyumun oosit/embriyoların *in vitro* yarıklanması üzerine optimal olmadığı görüldü. IVF aşaması için, değişik medyumların denenmesinin yararlı olabileceği kanısına varıldı.

IVF sonuçları düşük kalmış olmasına rağmen, sunulan çalışmada elde edilen embriyolar, Türkiye'de bu güne kadar *in vitro* fertilizasyonla üretilmiş olan ilk kedi embriyolarıdır.

Bundan sonraki çalışmalarda, *in vitro* yarıklanma oranlarının artırılmasına yönelik çalışmalarla birlikte, elde edilecek morula ve blastosistlerin dondurularak saklanması ve ardından hormonal olarak uygun duruma getirilmiş alıcı annelere transferi yoluyla yavru elde edilmesi hedeflenecektir.

Kaynaklar

1. Bogliobo 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.
2. Evecen M., Baran A., Tek, Ç.: The effects of gonadotropins on *in vitro* maturation of cat oocytes. *Turkish Journal Of Veterinary and Animal Sciences*, 2002; 26: 1315-1320.

3. **Goodrowe, K.L.:** Feline reproduction and artificial breeding technologies. *Anim. Reprod. Sci.*, 1992; 28: 389-397.
4. **Goodrowe, K.L., Hay, M., King, W.A.:** Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes in vitro. *Biol. Reprod.*, 1991; 45: 466-470.
5. **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.
6. **Lengwinat T., Pitra CH., 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.
7. **Luvoni, G.C, Pellizzari, P.:** Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology*, 2000; 53: 1529-1540.
8. **Pope, C.E.:** Embryo Technology in Conservation Efforts for Endangered Felids. *Theriogenology*, 2000; 53: 163-174.
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. *Animal Reproduction Science*, 1988; 53: 221-236.
10. **Pope, C.E., Mcrae, M.A., Clair, 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. **Pushet, T.D.A., Gunn, I.M., Trounson, A.O.:** Retrieval of parthenote-like embryos from the ovaries of domestic cats. *Theriogenology*, 1996; 1: 404 Abstr.
12. **Robinson J.J.:** Nutrition and Reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, 1996; 42:25-34.
13. **Wood, T.C., Byers, A.P., Jannette, B.D., Wildt, D.E.:** Influence of protein and hormone Supplementation in Vitro Maturation and Fertilization of domestic cat eggs. *J. Reprod. Fert.*, 1995; 104: 315-323.