

ÖZET METNİ

NÜKLEAR TRANSFERLERDE FÜZYON PARAMETRELERİNİN İNEK BLASTOSİST GELİŞİM ORANLARINA ETKİLERİ

S Arat₁, A Tas₁, G Cetinkaya₁, T Akkoc₁; H Bagis₁,
1.TUBITAK, MAM-Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli, Türkiye
E-mail: sezen.arat@mam.gov.tr

Nükleer transfer(NT) çalışmalarını yumurtanın aktivasyonunun kimyasal aktivasyon öncesinde uygulanan elektrik akımı ile başladığını göstermektedir.Bu nedenle somatik hücrelerin yeniden programlanmasında etkili birkaç parametreden biri de uygulanan füzyon parametreleridir.Bu çalışmada; füzyon parametrelerinin NT çalışmalarındaki embriyo gelişim oranlarına etkisi incelenmiştir.Çalışmada kullanılacak olgunlaşmamış sığır yumurtaları mezbahe materyalinden aspire edilmiş ve 10%FCS, sodyum piruvat, EGF, bLH, bFSH ve penisilin/streptomisin içeren TCM199 medyumunda 39°C%5CO₂'li inkübatörde 18 saat tutularak olgunlaştırılmıştır.Olgun yumurtalar(MII) kumulus hücrelerinden temizlendikten sonra metafaz pleytleri enüklasyon ile alınmıştır. Yerli Kara sığır ırkından elde edilen kıkırdak hücreleri nükleus kaynağı hücre olarak kullanılmıştır.NT sonrası yumurtalara iki ayrı füzyon parametresi uygulanmıştır.Birinci füzyonu takiben füzyon olmayan yumurtalar ikinci füzyona tabi tutulmuşlardır.Birinci füzyonda; 133V/500µm25µs1 atış(Grup1) ve 133V/500µm30µs1 atış(Grup2), ikinci füzyonda; 60V/500µm25µs 2 atış(Grup3) ve 70V/500µm40µs1 atış(Grup4) değerleri kullanılmıştır.Füzyon sonrası tüm gruplar aynı kimyasal aktivasyona tabi tutulmuşlardır. Sonuçlar karşılaştırıldığında birinci füzyon aşamasında Grup2'nin füzyon oranı(%71,87) Grup1'e(%51,28) göre anlamlı farklılık göstermiştir.Elde edilen blastosist oranlarına bakıldığında Grup2'de gelişme oranı yüksek olarak tespit edilmiştir(Grup1; %15 Grup2;%19,4).İkinci füzyon değerleri incelendiğinde; Grup 4'ün füzyon oranı anlamlı farklılık göstermiştir(G3;%27,58 G4;%41,5).Blastosist oranları bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (G3; %5,5 G4; %8,43).Bu sonuçlar NT'de füzyon parametresi olarak 133V/500µm 30 µs 1 atış değerinin füzyon oranını artırdığını ve embriyo gelişimi üzerinde olumlu etkiye sahip olduğunu göstermiştir.Ancak birinci füzyon ve ikinci füzyon sonrası blastosist gelişimine bakıldığında ikinci füzyondan sonra blastosist oranının ciddi oranda düştüğü görülmektedir. Bu durumun iki kez uygulanan elektrik akımının yumurtalar üzerinde yarattığı olumsuz etkiden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.Bu çalışma TÜBİTAK -TOVAG 104O360 ve KAMAG 106G005 projesi ile desteklenmiştir.

THE EFFECT OF FUSION PARAMETERS ON BOVINE BLASTOCYSTS DEVELOPMENT RATES ON NUCLEAR TRANSFER (NT)

S Arat₁, A Tas₁, G Cetinkaya₁, T Akkoc₁; H Bagis₁,
1.TUBITAK, Research Institute for Genetic Engineering, Gebze, Kocaeli, Turkey
Contact E-mail: sezen.arat@mam.gov.tr

NT studies showed that oocytes activation was started with electrical stimulation applied before chemical activation.Therefore; one of the several parameters effecting reprogramming of somatic cells is the fusion parameter.The objective of this study was to examine the effect of fusion parameters on blastocysts development rates on somatic cell cloning(SSC).Bovine oocytes isolated from slaughterhouse ovaries were matured in TCM199 supplemented with %10 fetal bovine serum (FBS), sodiumpyruvate, penicillin/streptomycin EGF bFSH, and bLH in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ in air for 18 hours.After maturation, cumulus cells were removed and oocytes were enucleated by aspirating the first polarbody and the metaphase II plate.Single cells derived from cartilage tissue of Anatolian Black cow were inserted into the perivitelline space of the enucleated oocyte.There are two different fusion parameters used after NT.The second fusion was performed on nonfused oocytes after the first fusion.In the first fusion; 133V/500µm,25µs1 pulse(Group1) and 133V/500µm,30µs1 pulse(Group2),in the second fusion; 60V/500µm25µs2pulse(Group3) and 70V/500µm,40µs1 pulse were used as fusion parameters. After fusion all groups were activated with same chemicals components. When the results were compared, significant difference on fusion rates was observed between Group2(%71,87) and Group1(%51,28).At the same time, the blastocysts rates were higher in Group2 than Group1(%19,4 and %15 respectively). The result of second fusion showed that Group4 had a higher fusion rate than Group3(%41,5 and %27,8 respectively).However, there was no significant differences between two groups on the blastocysts development rates(G3; %5,5 G4; %8,43).These results showed that parameter used for Grup2 was increased the fusion rate and has a positive effect on embryo development.However, when the blastocysts development rates after the first and second fusion were examined,it was visualized that the blastocysts development was seriously decreased after second fusion.This was considered as a negative effect of the electrical stimulation which was applied twice on oocytes.This study was supported by a grant from TUBITAK TOVAG 104O360 andKAMAG, Turkey (106G005).

Correspondence; S. ARAT, sezen.arat@mam.gov.tr