

ÖSTRUSTAKİ İNEK SERUMUNDA BULUNAN ÖSTRADİOL-17 β DÜZEYLERİNİN İNEK OOSİTLERİNİN İN VİTRO MATURASYON VE FERTİLİZASYONUNA ETKİSİ*

(The Effect of Estradiol-17 β Levels in Estrous Cow Sera on In vitro Maturation and Fertilization of Cow Oocytes)

Numan AKYOL¹

Nesrin SULU²

1. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Lalahan/Ankara
2. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı/Ankara

ÖZET

Bu çalışmada, mezbahadan toplanan inek oositlerinin maturasyon ve fertilizasyonuna; östradiol 17- β düzeyi belirlenmiş olan östrustaki inek serumu (ECS) etkisinin, FCS ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Siyah Alaca düvelerden östruslarının ilk 3 saati içerisinde alınan kanların serumları ile bu serumlardan hazırlanan stok serum bileşiminin ve FCS'nin içerdiği östradiol-17 β düzeyleri, RIA yöntemiyle belirlenmiştir. Morfolojik kalite sınıflamasına göre A ve B kalite olan inek oositleri kullanılmıştır. Maturasyon ortamlarında, %5, %10 ve %20 oranlarında olacak şekilde stok serum; kontrol grubunda ise aynı oranlarda FCS kullanılmış ve veriler varyans analizi kullanılarak test edilmiştir. Çalışma sonucunda düvelerin serumlarında sırasıyla; Döve1=18.4 pg/ml, Döve2=20.1 pg/ml, Döve3=21.8 pg/ml; stok serum bileşiminde ise 19.9 pg/ml; FCS içerisinde de, 34.8 pg/ml östradiol-17 β (E₂) düzeyi tespit edilmiştir. Grup 1'de, %5, %10 ve %20 serum katılım düzeylerine göre sırasıyla, 0.78 \pm 0.010^a, 0.84 \pm 0.009^b, 0.86 \pm 0.012^b maturasyon oranına ulaşılmış (p<0.01); Grup 2'de ise sırasıyla, 0.77 \pm 0.010^a, 0.82 \pm 0.008^b, 0.85 \pm 0.010^b maturasyon (p<0.01); 0.51 \pm 0.020^a, 0.51 \pm 0.023^a, 0.59 \pm 0.017^b fertilizasyon (p<0.01) oranına ulaşılmıştır.

Sonuç olarak, östrustaki düvelerden elde edilen serumların (ECS) inek oositlerinin in vitro maturasyonunda ekonomik bir şekilde kullanılabilceği, %10 ve %20 düzeylerinde katılan ECS ve FCS'nin %5 düzeyine göre daha yüksek maturasyon ve fertilizasyon sonucu verdiği görülmüştür.

Anahtar sözcükler: İn vitro, Maturasyon, Fertilizasyon, Oosit, Serum, ECS, FCS, İnek.

SUMMARY

The aim of this study was to compare influence of Estradiol-17 β levels measured in estrous cow sera (ECS) on oocytes from slaughtered in vitro maturation and fertilization with fetal calf sera (FCS). Three Holstein Friesian heifers were used for source of the sera. Blood was collected in the first 3 hours of the estrous from heifers and sera was decomposed from the blood then sera were mixed and stock serum was obtained. Level of estradiol-17 β in all the sera was analyzed by Radio Immuno Assay. Oocytes were selected and used as A and B quality grade morphologically. Stock serum was added in the maturation media 5%, 10% and 20%. The same proportions of FCS were added in the control group. Data were tested by ANOVA. Estradiol-17 β (E₂) levels in the heifers blood sample were found for Heifer1, Heifer2 and Heifer3 and stock serum as respectively; 18.4 pg/ml, 20.1 pg/ml, 21.8 pg/ml and 19.9 pg/ml. Estradiol 17- β was also measured 34.8 pg/ml in the FCS. For adding 5%, 10% and 20% proportions of ECS stock serum, the results were respectively; 0.78 \pm 0.010^a, 0.84 \pm 0.009^b, 0.86 \pm 0.012^b maturation (p<0.01). The results of addition of FCS as a control group for 5%, 10% and 20% sera levels were 0.77 \pm 0.010^a, 0.82 \pm 0.008^b, 0.85 \pm 0.010^b maturation (p<0.01); 0.51 \pm 0.020^a, 0.51 \pm 0.023^a, 0.59 \pm 0.017^b fertilization result (p<0.01).

As a result, estrous cow serum can be used economically for in vitro cow oocytes maturation. When ECS and FCS 10% and 20% were added in the maturation media, more better maturation and fertilization results were found according to 5% ECS and FCS.

Key words: : In vitro, Maturation, Fertilization, Oocyte, Serum, ECS, FCS, Cow.

* Aynı adlı doktora çalışmasından özetlenmiştir.

GİRİŞ

Kanagawa ve arkadaşlarının (16) bildirimlerine göre, in vitro üretilen ilk memeli, 1959 yılında Chang tarafından tavşanlardan elde edilmiştir. İlerleyen yıllarda, follikül ve oosit fizyolojileri, spermatozoonların dölleme yeteneklerinin dayandığı ilkelerin aydınlatılması ile birlikte in vitro embriyo üretimi alanında önemli gelişmeler yaşanmış ve bu teknik 1980'li yıllardan sonra, hayvan ıslahı alanında vazgeçilmez bir metot olarak yerini almıştır.

İneklerde Follikülogenez ve Oogenez: Follikülogenez, follikül oluşum ve gelişimi, oogenez ise ovum oluşumu ve gelişimini ifade etse de ikisi birbirinden tamamen farklı iki olgudur. Oogenez, çoğalma, büyüme ve olgunlaşma dönemlerini kapsamakta olup, ilkel oosit formundan primer oosit oluncaya dek geçen zamanı ifade etmektedir. Oositlerin ilkel formu olan oogoniumlardan bazısı daha gebeliğin 11 veya 12. haftasında birinci mayoz bölünmenin diyakinez aşamasına gelir (23). Mayozun bu aşamasında folliküler hücrelerce salınan Oosit Mayoz İnhibitörü (OMI) etkisiyle mayoz bölünme durdurulur ve bu aşamadan sonra primer oositler pubertaya kadar herhangi bir bölünme olmaksızın beklerler (2).

Nükleer Maturasyon : Nükleer maturasyon, oosit nükleusunun germinal vezikül aşamasından metafaz-II safhasına gelmesi durumudur. Nükleer maturasyon, germinal vezikül yıkımlanması (Germinal Vesicle Break Down-GVBD), kromozom kondenzasyonu, birinci metafazın iğ iplikçiklerinin oluşumu homolog kromozomların polar cisimcik vasıtasıyla atılması ve Metafaz-II durumuna geçilmesi olgularını kapsar. Redüksiyon bölünmesiyle birlikte kromozom sayısı haploid (n=30) duruma gelir (25).

Germinal vezikül yıkımlanması zamanında, kromozomlar kondense olup

kompakt bir hal alırlar. Sentrozom iki sentriole bölünerek yıldız şeklinde bir görünüm alır ve kutuplara doğru göç ederek iğ iplikçiklerini oluşturur. Bu aşamada oosit metafaz-I safhasındadır. Primer oosit artık iki mayoz bölünme geçirerek olgunlaşacaktır. Birinci bölünmeyle birlikte iki kardeş hücre meydana gelir ki, bunlardan biri sitoplazma yönünden zengin olup gerçek oositir. Diğeri ise sitoplazma yönünden fakir ancak yine de mitokondri, ribozom ve kortikal granüllere sahip olan, Polar Cisim adıyla bilinen hücredir. Nükleer maturasyonun başlaması için LH tetikleyici bir role sahiptir. Maturasyonun devamı için de başta östrojen olmak üzere steroidlere ihtiyaç vardır (13).

Sitoplazmik Maturasyon : Sitoplazmik maturasyon, oositin Germinal Vezikül safhasından Metafaz-II safhasına, olgun bir oosit oluncaya kadar geçirmiş olduğu yapısal değişimleri ifade eder. Bu değişimler, oositin normal fertilizasyonu, bölünmeye başlaması ve blastosit safhasına kadar ulaşmasında dolaylı olarak etkilidir. Polar cismin oluşmasıyla birlikte perivitellin boşluğun genişlemesi ve şekillenmesi, mitokondrilerin sayılarının artması ve yapısal değişimleri, golgi aygıtlarından kortikal granül salınmasıyla birlikte ooplazmanın granüllü bir hal alması, sitoplazmik maturasyonun başlamasıyla birlikte ortaya çıkan olgulardır. Başlangıçta merkezi olarak yer alan mitokondriler oositin gelişimi ile birlikte periferal bir konum alırlar. Mitokondriler, sitoplazmik maturasyonda anahtar rolü üstlenirler. Hücre içi metabolik modifikasyon, farklılaşma ve proliferasyon gibi aktivitelerde hep mitokondriler vardır (20). Sitoplazmik maturasyonun morfolojik olarak, kayda değer bir diğeri parametresi de kumulus hücre ekspansiyonudur (15).

Spermatozoa Kapasitasyonu : Hiçbir memeli türünde, spermatozoa dişi genital kanalına bırakıldığı anda fertilizasyon

yapabilme yeteneğinde değildir. Bundan dolayı fertilizasyona hazırlık sürecinin geçirilmesi gerekir. Kapasitasyon, spermatozoonların ovum içerisine girebilmek için gerekli akrozom reaksiyonuna yol açacak, fizyolojik ve biyokimyasal olayların tümü olarak tanımlanır. Kapasitasyon olgusunda, uterus, ovidukt ve ovulasyon esnasında folliküler sıvı görev alır (26, 33).

Fertil boğa, çiftleşme esnasında bir kaç milyardan fazla motil spermatozoonu dışı genital kanalına bırakır. Spermatozoonların genital kanal boyunca yolculukları esnasında güçlü bir seleksiyon süreci işler. Bu göç sırasında çok sayıda spermatozoon ölür veya fagosite edilir. Yalnızca birkaç bin canlı spermatozoa oviduktun kaudal isthmus bölgesine gelerek burada bir spermatozoon deposu oluştururlar. Buradan çıkacak fertilizasyon yeteneği en iyi spermatozoonlar, oositle temasa hazır olurlar. Dışı genital kanalında, kapasitasyondan sorumlu olduğu bilinen, glikozaminoglikanlar (GAG), kondroitin sülfatlar ve heparin benzeri maddeler bulunmaktadır (13, 37).

Akrozom Reaksiyonu : Akrozom, spermatogenez sırasında golgi kompleksinden gelişen nukleusun hemen hemen yarısını örten hyaluronidaz ile proakrozin enzimi içeren bir organeldir. Kapasite olmuş spermatozoa, kumulus ooforus ile teması esnasında akrozom reaksiyonuna uğrar. Bu esnada akrozomun posterior kısmı ekvatoryal segment dışında plazma membranı ile; dış akrozomal membran da birçok noktada birbiriyle birleşerek küçük veziküller şekillendirirler. Bu veziküller arasındaki boşluklardan akrozomal içerikteki enzimler dışarı çıkar. Reaksiyon sonunda akrozom tümüyle parçalanır ve spermatozoon başı yalnızca iç akrozomal membranla sarılı olarak kalır (32).

Akrozom reaksiyonu sonucu serbest kalan, özellikle hyaluronidaz gibi enzimler,

kumulus ooforus hücrelerini birbirine bağlayan ve bir hyaluronik asit kompleksi olan bağları eritir. Bu arada motilitesi artmış olan spermatozoonun aktif kuyruk hareketleri yardımıyla bu hücreler geçilmiş olur. Akrozom reaksiyonu, hücre dışında bulunan Ca^{++} yardımıyla başlatılır. Akrozom içine alınan Ca^{++} , proakrozini aktif formu olan akrozine dönüştürür. Akrozin ile birleşmiş plazma membranı ve dış akrozomal membranın çeşitli noktalardan eriyip parçalanmasına neden olur. Bu parçalanma sonucu akrozomal enzimler de serbest kalır (13).

Spermatozoon kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu, inekte altı saat içinde tamamlanır. Bu arada östradiol etkisiyle ovidukt silier hücreleri uyarılmış olduğundan, bunların aktivasyonları ile ovum ritmik olarak oviduktun alt kısımlarına doğru ilerletilir ve bu esnada kumulus hücrelerinin çoğunu kaybeder (18).

Fertilizasyon : Akrozomdan enzim karakterli aktif maddelerin serbest kalması spermatozoon ve zona pellusida arasındaki penetrasyonun şekillenmesi açısından zorunlu bir gelişmedir. Zona pellusida pek çok memeli türünde üç farklı glikoproteinden oluşur bunlar; Zona glikoprotein 1, 2 ve 3 tür (ZP1, ZP2, ZP3). Zona glikoproteinlerinden, ZP3'ün spermatozoonla zona arasındaki bağın oluşmasında diğerlerine göre daha etkin olduğu kabul edilir ve bu işlem, türe özel olarak gerçekleşir. Zona pellusidayı geçen spermatozoon perivitellin boşluğu da kısa sürede geçerek ovuma yaklaşır. Spermatozoon başı ovuma ulaşır ulaşmaz, ovum yüzeyinde bulunan çok sayıda mikrovillus tarafından sarılır. Plazma membranları arasında birleşme devam ederken aktif kuyruk hareketleri ile kuyruğun tamamı perivitellin boşluğuna girer. Plazma membranı (oolemma) ile temas ve penetrasyon oosite ikinci mayoz bölünmeyi tetikler ve oositin bölünmesini tamamlayıp ikinci polar cismi de

atmasıyla, oosit tam olarak fertilizasyona hazır hale gelmiş olur. Spermatozoonun ooplazma içine girmesinin ardından pronükleer formasyon ve singami gelişir (8).

Bu çalışmada, östrus evresinde kanları alınarak östradiol 17- β (E_2) düzeyleri saptanan sığır serumlarının (ECS); TCM-199 mediumuna değişik oranlarda ilave edilerek, mezbahadan toplanan inek oositlerinin maturasyon ve fertilizasyonuna etkisi ile, TCM-199 mediumuna aynı oranlarda katılan fetal buzağı serumunun (FCS) etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Serum kaynağı olarak, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Entitüsünde yetiştirilen, bir yaşında, Siyah Alaca ırkı üç düve kullanılmıştır. Östrus başlangıcından itibaren ilk 3 saat içerisinde kan alınmış ve serumlar ayrılmıştır. Serumlar daha sonra 56°C'de 30 dakika su banyosunda tutularak inaktivasyonları yapılmış ve her düveye ait serumdan eşit miktarlarda alınarak stok serum bileşimi elde edilmiştir.

Östrustaki inek serumları (ECS) ile Fetal Buzağı Serumlarının (FCS) içerdiği E_2 düzeyleri RIA (Radio Immuno Assay) yöntemiyle tespit edilmiştir.

Mezbahada kesimi yapılan ineklerden toplanan 457 adet ovaryum, taşıma ortamına alınmadan önce gereksiz dokulardan ve yüzeysel kandan arındırılmıştır.

Ovaryum taşıma solusyonu olarak, %0.9 NaCl içeren, steril fizyolojik tuzlu su kullanılmıştır. Laboratuvarında taze olarak hazırlanan solusyon kullanılmadan önce 30°C'ye kadar ısıtılarak, içerisine 0.1 mg/ml Kanamisin Sülfat (Kanovet-Vetaş) ilave edilmiştir (14).

Foliküler aspirasyon amacıyla Scellander ve arkadaşlarının (30) uyguladığı şekilde, 5 ml'lik enjektör ve ucuna takılmış

21 G' luk iğneden yararlanılmıştır. Aspirasyondan önce enjektör içerisine yaklaşık 1 ml yıkama mediumu olarak kullanılan fosfat tampon mediumu (m-PBS) çekilerek 2-7 mm arasında çapa sahip folliküllerden aspirasyon yapılmış, ardından Takagi ve arkadaşlarının (34) tarif ettikleri şekilde, ovaryum dilimlenerek elde edilen oositler, yıkama mediumuyla yıkanmış ve 95 mm'lik altı çizili petrilere alınmıştır.

Oosit seçimi Brackett ve Zuelke'nin (6) yöntemine göre yapılmıştır. Bu amaçla stereo mikroskop altında, kumulus oosit kompleksine (COC) sahip, ooplazması homojen görümlü oositler içerisinden A ve B kalitede olanlar in vitro maturasyon amacıyla seçilmiştir. Stereo mikroskop altında seçilen kumulus hücrelerine sahip oositler, 35 mm petrilere (Falcon-1008, Dickinson) içerisinde hazırlanarak inkubatörde ekilibrasyonları yapılmış olan maturasyon mikrodamlarına alınmıştır (16).

Maturasyon mediumu olarak Kanagawa ve arkadaşlarının (16) bildirdiği şekilde, Doku Kültürü Mediumu, TCM-199 (M7528, Sigma-Aldrich Co.) kullanılmıştır. Maturasyon mediumuna; 0.1mg/ml L-Glutamin (G8540, Sigma-Aldrich Co.), 100 IU/ml kristalize penisilin-G potasyum (İ.E. Ulugay) ve 100 μ g/ml kristalize streptomisin sülfat (İ.E. Ulugay) ilave edilmiştir. Deneme gruplarına, önceden hazırlanan stok serumdan %5, %10 ve %20 oranlarında, kontrol grubuna ise aynı oranlarda FCS (F2442, Sigma-Aldrich Co.) ilave edilmiştir. Maturasyon amacıyla 35 mm kültür petrilere (Falcon-3001), 100 μ l hacimde mikrodamlar hazırlanarak üzerine 4.5 ml mineral yağ (M8410, Sigma-Aldrich Co.) ilave edilmiştir. Hazırlanan bütün maturasyon mediumlarının oositlerin yerleştirilmesinden en az 3 saat önce, %95'in üzerinde bağıl nem ve %5 CO₂ içeren 39°C'deki inkubatöre konarak ekilibrasyonları yapılmıştır.

Her maturasyon petrisinde 100 μ l maturasyon mediumu ile mikrodamlar hazırlanıp, 20 oosit/100 μ l mikrodamlarla olacak şekilde oositler yerleştirilmiştir. Oositlerinin in vitro maturasyon işlemi, %5 CO₂, %95'in üzerinde bağıl nem ve 38.5°C'de, 22 saatte gerçekleştirilmiştir. İnkubasyon periodu sonunda, stereo mikroskop altında kumulus ekspansiyonu görülenler mature oosit kabul edilmiştir (34).

İn vitro fertilizasyon amacıyla Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Suni Tohumlama Laboratuvarında üretilen ve içerisinde 175x10⁵ spermatozoa bulunan 0.25 ml'lik ticari mini-payetlerde dondurulmuş Siyah Alaca ırkı boğa spermaları kullanılmıştır. İn vitro fertilizasyonda farklılığa meydan vermemek amacıyla, bir boğadan, aynı gün alınarak dondurulan, eşdeğer motiliteye sahip spermalar ve kapasitasyon amacıyla da Brackett & Oliphant (BO) mediumu kullanılmıştır. Kapasitasyon işlemleri ve uygun spermatozoa yoğunluğunun elde edilmesi amacıyla, Kanagawa ve arkadaşlarının (16) tarif ettiği sisteme göre; 37°C'deki su banyosunda 20-30 saniyede çözdürülen spermalar (4-5 payet), 15 ml hacmindeki boş santrifüj tüplerine alınarak, üzerlerine 6 ml Sperm Yıkama Solusyonu (SYS) eklenmiş ve 1800 rpm devirde 5 dk santrifüj edilmiştir. Sifon yaptırılarak süpernatantın ayrılmasının ardından işlem tekrarlanmıştır. Spermatozoonların sayımlarının kolay yapılabilmesi amacıyla sedimentin üzerine yaklaşık 1 ml SYS ilave edildikten sonra, sayım yapılarak sedimentin içerdiği spermatozoa miktarı bulunmuştur. SYS ve Sperm Sulandırma Solusyonları (SSS) kullanılarak spermatozoonlar sulandırılmıştır. Spermatozoonların sayımları Thoma lamı kullanılarak yapılmıştır. Sayım öncesi spermatozoa yoğunluğunu azaltmak amacıyla %5 NaCl içeren solusyonla 1/100 oranında sulandırma işlemi yapılarak son yoğunluk, 6.25x10⁶/ml spermatozoa olacak şekilde

fertilizasyon mediumu hazırlanmıştır. SSS ile son sulandırması yapılan spermatozoonlar, fertilizasyon mikrodamlarına (95 μ l) alınarak inkubatöre yerleştirilip, oositler Oosit Yıkama Solusyonu (OYS) ile yıkandıktan sonra toplam 30 dakika içerisinde bu mikrodamlara yerleştirilmiştir (19).

Embriyoların in vitro kültürü için aminoasitli Charles Rosencrans (CR1aa) mediumu kullanılmıştır. CR1aa mediumu taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır (16). İn vitro fertilizasyonun ardından oositlerin etrafını saran kumulus hücreleri pipetleme işlemiyle uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla, steril cam Pastör pipetleri kullanılarak işlem en kısa sürede (10-15 dk) tamamlanmıştır (19). Kumulus hücrelerinden pipetleme işlemiyle uzaklaştırılan oositler maturasyon sürecinde olduğu gibi, 20 oosit/100 μ l mikrodamlarla olacak tarzda yerleştirilmiştir. Kanagawa ve arkadaşlarının (16) yöntemine göre, bu işlemden önce oositler, en az 3 saat önceden hazırlanıp inkubatöre kaldırılmış ve içerisinde oositlerin yıkanması amacıyla kültür mediumu konmuş olan 35 mm'lik petrilerin değişik yerlerinde birkaç kez yıkanarak kalan kumulus hücreleri ve spermatozoonlardan arınmaları sağlanmış-tır. İn vitro embriyo kültürü amacıyla %5 CO₂, %95'in üzerinde bağıl nem ve 38.5°C merkezi sıcaklıktaki inkubatör (Inco2, Memmert-Germany) kullanılmıştır.

Bölünme kontrolleri, embriyoların inkubasyona alınmasını takip eden 48. saatte yapılmıştır. Bölünenlerin sayısı fertilize oosit sayısı olarak kabul edilmiştir (5).

Partenogenetik bölünme kontrolünü yapmak üzere, her mezbaha çalışmasında mikrodamlardan rastgele alınan yaklaşık 20 oosit, fertilizasyon yeterliliğinde olmayan (birkaç kez dondurulup çözdürülürülerek öldürülmüş) spermatozoonlarla fertilizasyon sürecine alınmıştır. Fertilizasyon kontrolünde bölündüğü belirlenen oositler, partenogenetik bölünme olarak kaydedilmiştir (1).

Verilerin test edilmesinde, tek yönlü Varyans analizi kullanılmıştır. Östrustaki inek serumu ve FCS katılım oranları bakımından farklı olan grupların değerlendirilmesinde Duncan testinden yararlanılmıştır.

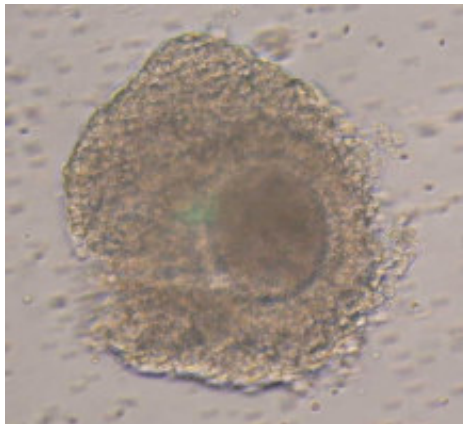
BULGULAR

Östrustaki düvelerin kan serumlarında ve FCS (F2442, Sigma-Aldrich Co.) içerisindeki östradiol 17- β (E_2) düzeyleri sırasıyla; Düve1=18.1 pg/ml, Düve2=20.1 pg/ml, Düve3=21.8 pg/ml ve FCS=34.8 pg/ml olarak ölçülmüştür. Kontrol grubu dışındaki çalışma gruplarında kullanılmak üzere hazırlanan stok serum bileşiminin östradiol 17- β (E_2) düzeyi, Stok=19.9 pg/ml olarak ölçülmüştür.

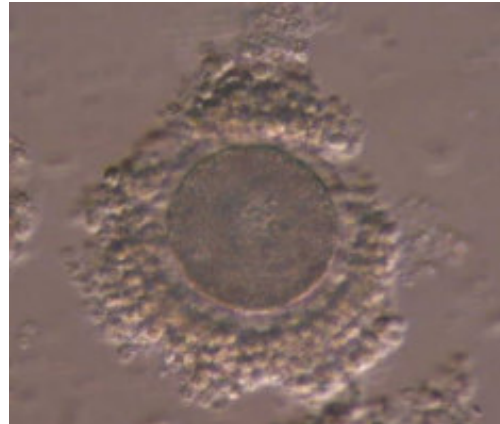
Çalışmada, 457 ovaryum toplanmış ve bu ovaryumlardan 3323 iyi kalite (A ve B kalite) oosit elde edilmiştir. Bunlardan 1993'ü ECS deneme grupları için; 1330'u FCS kontrol grupları için kullanılmıştır. Elde edilen oositlerin morfolojik değerlendirmelerinde, A kalite olanların 4 veya daha fazla sayıda kumulus hücre sırasına sahip oldukları, kumulus hücrelerinin kompakt yapıda ve oositi sıkıca çevreledikleri, oositlerin de homojen yapıda bir ooplazmaya sahip oldukları (Resim 1); B kalite oositlerin, birkaç kumulus hücre sırasıyla ve A kalite oositlere göre daha gevşek bir şekilde sarılı oldukları, bazı bölgelerinde kumulus hücrelerinin

bulunmadığı, ooplazmalarının koyu granüller içerdiği gözlenmiştir (Resim 2).

İn vitro maturasyon mediumuna ECS katkısı yapılan çalışma grubunda, 1993 oositten 1649'unda kumulus ekspansiyonu görülerek bu oositlerin mature oldukları kabul edilmiştir. ECS'nin, %5, %10 ve %20 oranlarında katıldığı Grup 1'de sırasıyla, %78, %84 ve %86 maturasyon; %5, %4 ve %4 dejenerasyon bulgusu elde edilmiştir (Tablo 1). Dejenerasyonlar arasında istatistiki fark bulunmazken; %10 ve %20 oranında ECS katılan grupların maturasyon oranları %5 ECS katılan gruba göre yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Grup 2'de %5, %10 ve %20 oranlarında FCS katılmış ve sırasıyla, %77, %82 ve %85 maturasyon bulgusu elde edilmiş olup; %10 ve %20 FCS katılan gruplarda, %5'e göre daha yüksek maturasyon oranı elde edilmiştir ($p<0.01$). Sırasıyla, %3, %4 ve %4 dejenerasyon bulgusuna ulaşılan gruplar arasında istatistiki olarak bir fark görülmemiştir (Tablo 2). Çalışmada ulaşılan maturasyon ve dejenerasyon sonuçları yönünden, ECS deneme ve FCS kontrol grupları arasında istatistiki bir fark gözlenmemiştir. Fertilizasyon sürecine 2402 mature oositin 48. saatte yapılan mikroskobik incelemelerinde, iki ya da daha çok sayıda bölünen 1220 embriyonun fertilize oldukları kabul edilmiştir (Resim 3-4).



Resim 1. A kalite oosit



Resim 2. B kalite oosit

Tablo 1. Östrustaki inek serumu (ECS) katkılı deneme gruplarında bulunan maturasyon ve dejenerasyon sonuçları

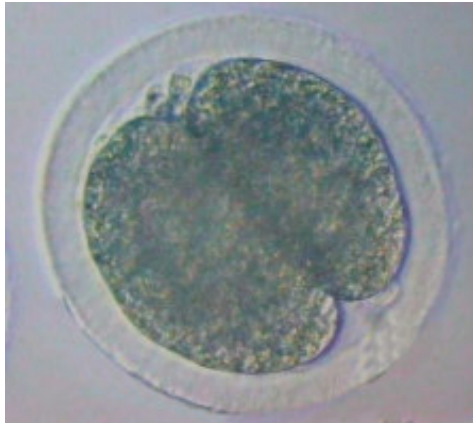
ÖZELLİK				
Maturasyon mediumuna katılan serum düzeyi (v/v)	% 5	% 10	% 20	Genel
Tekrar sayısı	29	35	33	97
Maturasyona alınan oosit (n)	605	742	646	1993
Mature olan oosit (n)	473	625	551	1649
Maturasyon oranı (%)**	0.78 \pm 0.010 ^a	0.84 \pm 0.009 ^b	0.86 \pm 0.012 ^b	0.83 \pm 0.007
Dejenere olan oosit (n)	27	27	24	78
Dejenerasyon oranı (%)	0.05 \pm 0.007	0.04 \pm 0.005	0.04 \pm 0.007	0.04 \pm 0.004

a, b : Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler birbirinden istatistikî olarak farklıdır (p<0.01)
** : P<0.01

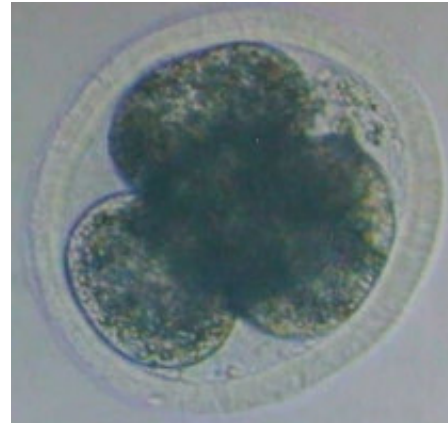
Tablo 2. Fötal buzağı serumu (FCS) katkılı kontrol gruplarında bulunan maturasyon ve dejenerasyon sonuçları

ÖZELLİK				
Maturasyon mediumuna katılan serum düzeyi (v/v)	% 5	% 10	% 20	Genel
Tekrar sayısı	20	22	22	64
Maturasyona alınan oosit (n)	430	456	444	1330
Mature olan oosit (n)	332	376	374	1082
Maturasyon oranı (%)**	0.77 \pm 0.010 ^a	0.82 \pm 0.008 ^b	0.85 \pm 0.010 ^b	0.82 \pm 0.007
Dejenere olan oosit (n)	14	16	18	48
Dejenerasyon oranı (%)	0.03 \pm 0.008	0.04 \pm 0.008	0.04 \pm 0.008	0.04 \pm 0.005

a, b : Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler birbirinden istatistikî olarak farklıdır (p<0.05)
** : P<0.01



Resim 3. İki hücreli bir embriyo



Resim 4. Dört hücreli bir embriyo

Fertilizasyon sürecine alınan oositlerden % 5, % 10 ve % 20 ECS katılan gruplarda sırasıyla, % 47, % 47 ve % 53 oranında fertilizasyon bulgusuna ulaşılmış olup; grup içi karşılaştırmada fertilizasyon oranları açısından önemli bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 3). Ancak Tablo 4'te görüldüğü gibi, aynı oranlarda FCS katılan

gruplarda sırasıyla, %51, %51 ve %59 oranında fertilizasyon bulgusu saptanmış olup; %20 oranında FCS katılan grubun, %5 ve %10 oranlarında FCS katılan gruplardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). İn vitro fertilizasyon bulguları bakımından ECS deneme ve FCS kontrol grupları arasında istatistiki olarak bir fark belirlenmemiştir.

Tablo 3. Östrustaki inek serumu (ECS) katkılı deneme gruplarında bulunan fertilizasyon sonuçları

ÖZELLİK				
Maturasyon mediumuna katılan serum düzeyi (v/v)	% 5	% 10	% 20	Genel
Tekrar sayısı	29	35	33	97
Fertilizasyona alınan oosit (n)	408	559	487	1454
Fertilize olan oosit (n)	188	266	258	712
Fertilizasyon oranı (%)	0.47±0.023	0.47±0.016	0.53±0.024	0.49±0.012

Tablo 4. Föetal buzağı serumu (FCS) katkılı kontrol gruplarında bulunan fertilizasyon sonuçları

ÖZELLİK				
Maturasyon mediumuna katılan serum düzeyi (v/v)	% 5	% 10	% 20	Genel
Tekrar sayısı	20	22	22	64
Fertilizasyona alınan oosit (n)	290	326	332	948
Fertilize olan oosit (n)	148	166	194	508
Fertilizasyon oranı (%)	0.51±0.020 ^a	0.51±0.023 ^a	0.59±0.017 ^b	0.54±0.012

a, b : Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler birbirinden istatistiki olarak farklıdır ($p<0.05$)

** : $P<0.01$

Çalışmada, partenogenetik olarak bölünen oositlerde, oldukça yoğun bir şekilde granül bulunduğu, blastomer dejenerasyonunun ise vitellin bölgesinde erimelerle karakterize bir tarzda olduğu gözlenmiştir. Mature oositlerin bulunduğu çalışma gruplarından rastgele alınan 287 oosit, ölü spermatozoonlarla fertilizasyon işlemine alın-

mıştır. Embriyo kültürünü takip eden 48. saatte yapılan bölünme kontrolünde; FCS grubunda %5.45, ECS grubunda ise %3.95 oranında partenogenetik bölünme olduğu gözlenmiştir (Tablo 5). Patenogenetik bölünme oranlarının tespiti kuramsal bir anlam taşıdığından istatistik modele dahil edilmemiştir.

Tablo 5. Gruplara göre partenogenetik bölünme sonuçları

ÖZELLİK			
Serum tipi	ECS	FCS	Genel
Tekrar sayısı	9	6	15
Partonegeneze alınan oosit (n)	177	110	287
Partenogenetik bölünen oosit (n)	7	6	13
Partenogenetik bölünme oranı (%)	3.95	5.45	4.53

TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığır oositlerinin maturasyon ve fertilizasyon çalışmalarında, oositlerin maturasyon ve fertilizasyon oranlarını artırmak amacıyla temel maturasyon ortamlarına çok sayıda katkı maddesi ilave edilmekte ve bunlardan ECS ve FCS oosit gelişimine olumlu etkilerinden dolayı önemli bir yer tutmaktadır (10,13). Plasentada üretilen hormonlar kan dolaşımı yoluyla yavruya da geçmektedir. Dolayısıyla fötusta, plaseenta kaynaklı östradiol 17-β düzeyleri annenin serum düzeylerine yakındır. İnek oositlerinin maturasyon yeteneğinin artırılması amacıyla fötal serum kullanan Younis ve arkadaşları (39), ticari FCS preparatında bulunan östradiol 17-β düzeyini, 37.7 pg/ml olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, in vitro maturasyon amacıyla maturasyon vasatına katılan ticari FCS preparatı içerisindeki östradiol 17-β düzeyi, 34.8 pg/ml olarak belirlenmiştir. Bu düzey, Younis ve arkadaşlarının (39) bulgularına uygunluk göstermektedir.

Granuloza hücreleri tarafından in vivo koşullarda üretilerek salınan östradiol 17-β'nin oosit maturasyonunu desteklediği ve bu steroid hormonun yoğunluğunun folliküler atrezinin gelişiminde belirleyici rol aldığı bildirilmiştir (7). Östradiol 17-β, inek oositlerinin in vitro maturasyon ortamlarına, ticari preparat halinde (6, 17) veya östrustaki ineklerden elde edilen serumlar şeklinde dolaylı olarak katılmaktadır (21,22).

Maturasyon ortamına (TCM-199) katılan ECS oranlarının in vitro oosit maturasyonunun oluşumunda önemli olduğunu bildiren Ocana ve arkadaşları (27), maturasyon ortamına, %0, %10, %20 ve %50 oranlarında ECS ilave ettikleri çalışmalarında sırasıyla, %41.8, %78.1, %80.3 ve %65.3 oranında maturasyon oranı elde etmişler ve %10 ve %20 oranında ECS eklenen grubun sonuçlarının diğer gruplara göre üstün olduğunu bildirmişlerdir (p<0.01).

Bu araştırmada, ECS katılım oranları açısından, %10 ve %20 katılım oranının, %5'e göre üstün olduğu (p<0.01), dolayısıyla daha yüksek maturasyon sonucu verdiği ve bu sonucun, aynı maturasyon vasatı ve kültür şartlarını kullanan Ocana ve arkadaşlarının (27) bulguları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Younis ve arkadaşları (39), %20 (v/v) oranında östrustaki inek serumu ve kontrol grubu olarak %20 (v/v) oranında FCS'yi kullandıkları çalışmalarında; inek serumlarının kullandığı grupta maturasyon oranının %89.7, FCS kullanılan grupta ise %62.9 olduğunu ve bu sonucun inek serumu lehine önemli düzeyde farklı olduğunu bildirmişlerdir (p<0.05). Ocana ve arkadaşları (28), inek oositlerinin in vitro maturasyon vasatlarına %20 (v/v) oranında östrustaki inek serumu (ECS) ve fötal buzağı serumu (FCS) kattıkları ve maturasyon oranlarını belirledikleri

çalışmalarında; ECS ve FCS ilave edilen gruplarda elde edilen maturasyon oranlarını sırasıyla % 75.0 ve % 77.0 olarak tespit etmişler, ancak istatistiki bir farklılık saptamamışlardır.

Schellander ve arkadaşları (30), in vitro maturasyon vasatına %20 (v/v) oranında FCS ve ECS ilave ettikleri ve farklılık saptamadıkları çalışmalarında; FCS ilave ettikleri grupta %83.9 oranında, ECS kullandıkları grupta ise %75.1 oranında maturasyon bulgusuna ulaşmışlardır.

Liu ve arkadaşları (21), %10 oranında ECS ve FCS kullandıkları çalışmalarında, her iki grupta da, %86.0 oranında maturasyon bulgusuna ulaşmışlardır. Wiemer ve arkadaşları (38), %10 oranında FCS ve hormon katkılı maturasyon ortamı ile %91.3 maturasyon bulgusuna ulaşırken; %20 ECS katkılı grupta bu oran %73.3 olmuştur. Bu araştırmacılar maturasyon ortamına hormonla birlikte %10 FCS katkısının, %20 ECS katkısına göre daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir ($p<0.05$). Benzer bir çalışmada Fukui ve Ono (12), %20 oranında FCS ve ECS'yi hormon ve hücre kombinasyonları ile birlikte kullandıkları çalışmalarında; FCS katılan grupta %52.7, ECS katılan grupta ise %51.2 oranında maturasyon bulgusuna ulaşmışlardır. Adı geçen araştırmacılar oositlerin in vitro maturasyonunda, FCS'nin ECS'ye göre üstün olduğunu vurgulamışlardır ($p<0.05$).

Bu çalışmada, ECS ve FCS grupları arasında maturasyon sonuçları açısından istatistiki bir farklılık saptanmamıştır. Çalışma bu yönüyle, Younis ve arkadaşlarından (39) farklı bulunurken; Schellander ve arkadaşları (30), Liu ve arkadaşları (21) ve Ocana ve arkadaşlarının (28) bulgularıyla uyumlu bulunmuştur. Her iki grupta erişilen maturasyon sonuçları yönüyle, %20 ECS katılan grubun maturasyon bulgusu; Younis ve arkadaşlarına (39) göre düşük kalırken, Fukui ve Ono (12),

Schellander ve arkadaşları (30) ve Ocana ve arkadaşlarına (28) göre yüksek bulunmuştur. %20 oranında FCS eklenen grubun sonuçları ise; Younis ve arkadaşları (39), Fukui ve Ono (12) ve Ocana ve arkadaşlarından (28) yüksek çıkarken, Scellander ve arkadaşlarının (30) bulgularına büyük oranda benzediği görülmüştür. İn vitro maturasyon ortamlarına yapılan %10 ECS ve %10 FCS katkıları yönüyle çalışma; Liu ve arkadaşlarının (21) bulgularına benzediği görülmüştür. Çalışmada ulaşılan maturasyon bulguları, %10 ECS katkısı yönüyle Wiemer ve arkadaşlarından (38) düşük kalmıştır.

Younis ve arkadaşları (39) ve Wiemer ve arkadaşlarının (38) in vitro maturasyon bulgularının sunulan çalışmaya kıyasla yüksek olmasını, ovaryumların alındığı hayvanların reproduktif farklılığına ve araştırmacıların in vitro maturasyon vasatına serumun yanı sıra hormon katkısı yapmış olmalarına bağlamak mümkündür. Gerek ECS, gerekse FCS kullanılan gruplarda görülen farklı oranların, diğer çalışmalarda kullanılan farklı çalışma ortamları, vasat bileşimleriyle ve kullanılan kültür vasatlarının ürün numarasıyla ya da maturasyon ölçütlerinin değişkenliği ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Dong ve arkadaşları (11), maturasyonu inceledikleri çalışmalarında; %2 ile %4 arasında dejenerasyon oranı saptamışlardır. Ocana ve arkadaşları (28), maturasyon ortamına %20 oranında ECS ve FCS kattıkları gruplarda sırasıyla %3 ve %2 dejenerasyon bulgusu elde etmişlerdir. Ün ve Küplülü (36), follikül büyüklüğüne göre sınıflandırdıkları gruplarda anormal maturasyon ve dejenerasyon oranlarını birlikte değerlendirmişler ve sırasıyla % 8 ve % 5.1 oranlarında dejenerasyon oranı saptamışlardır.

Bu çalışmada ulaşılan dejenerasyon sonuçları, Dong ve arkadaşları (11), Ocana ve arkadaşları (28) ve Ün ve Küplülü'nün (36)

sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Dejenerasyon oranları in vitro maturasyon sürecine alınan oositlerin kaliteleri ve maturasyon ortamlarına yapılan katkılarla doğrudan ilgili olduğundan gelişim için uygun olmayan oositlerin bu sürece dahil edilmesi, hormon ya da antioksidanlarla in vitro oosit maturasyonunun desteklenmemesi durumlarında dejenerasyon oranının yüksek çıkacağı düşünülmektedir.

Saeki ve arkadaşlarının (29), maturasyon ortamına serum katılmasının oositlerin in vitro maturasyon ve fertilizasyon oranlarını artırdığını vurguladıkları çalışmalarında; %10 FCS kullandıkları grupta %64, ve FCS kullanmadıkları grupta ise %48 fertilizasyon oranı tespit etmişler, fertilizasyon oranları arasındaki farklılığın önemli olduğunu bildirmişlerdir ($p<0.05$).

Fukui ve Ono (12), in vitro fertilizasyonda, FCS'nin ECS'ye göre daha üstün olduğunu bildirdikleri çalışmada, %20 oranında FCS katılan grupta %58.2; aynı oranda ECS katılan grupta ise %41.7 fertilizasyon oranı elde etmişlerdir ($p<0.05$). Aynı araştırmacılar; in vitro maturasyon ortamına katılan FCS'nin polispermik fertilizasyonu artırdığını, değişik maturasyon ve in vitro fertilizasyon sonucu verebilecek çok sayıda ticari FCS preparatı olduğunu hatırlatmışlardır.

Schellander ve arkadaşları (30), %20 FCS ve %20 ECS gruplarına hormon (LH, E₂) katarak sırasıyla, %78.5 ve %71.3; yalnızca %20 FCS kullanarak %29.8 oranında fertilizasyon bulgusuna ulaşmışlardır. Araştırmacılar oositlerin in vitro fertilizasyon işleminde swim-up metodunu ve TALP vasatını kullanmışlardır. Benzer bir çalışmada Younis ve arkadaşları (39); %20 oranında FCS ve ECS kullanarak sırasıyla, %54.5 ve %78.5 oranında fertilizasyon bulgusu elde etmişler ve bu oranların ECS lehine yüksek olduğunu bildirmişlerdir ($p<0.05$). İn vitro maturasyon ortamına %10 oranında FCS katan ve

spermatozoonların hazırlanmasında BO vasatından yararlanan Chian ve arkadaşları (9), % 91.3 oranında fertilizasyon bulgusuna ulaşmışlardır.

Birler ve arkadaşları (4), maturasyon ortamına %20 oranında ECS ilave ettikleri çalışmalarında, %10.0 ile %39.3 arasında değişen oranlarda fertilizasyon sonucuna ulaşmışlar; düşük bulunan sonucun mezbaşa materyalinin düşük genetik yapıya sahip olmasına bağlamışlardır. %20 oranında ECS kullanan Tekin ve arkadaşları (35) ise %29.2 ile %34.2 arasında elde ettikleri, fertilizasyon bulgularının düşük olduğunu bunun da maturasyon sırasındaki bazı problemlerden kaynaklandığını vurgulamışlardır.

Bu çalışmada, %20 oranında FCS katılan grubun fertilizasyon başarısı, %5 ve %10 oranında FCS katılan gruba göre yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). ECS katılan gruplar karşılaştırıldığında; %20 katılım oranı ile %5 ve %10 serum düzeyleri arasında matematiksel olarak fark olmasına rağmen, gerek ECS katılan gruptaki katılım oranları arasında, gerekse FCS ve ECS gruplarının ortalama fertilizasyon bulguları arasında istatistiki bir farklılığa rastlanmamıştır.

İN vitro maturasyon ortamına yaygın olarak yapılan serum katılım düzeyleri %10-20 arasındadır (3,13,31). Buna göre, serum katılım oranlarının in vitro oosit fertilizasyonu üzerine etkisinin bu oranlarda optimum olduğunu ifade etmek mümkündür. Bu çalışmada da, %10 ve %20 oranlarında katılan serumların %5 katılım düzeyine göre matematiksel olarak daha yüksek fertilizasyon oranı sağladığı görülmektedir. Fötal Buzağı Serum ve ECS'nin ortalama fertilizasyon bulguları açısından bakıldığında, çalışmada; FCS'nin ECS'ye göre üstün olduğu, ancak oranlar arasında istatistiki bir farklılık olmadığı anlaşılmaktadır. Bu yönüyle değerlendirildiğinde bulguların; Fukui ve Ono, (12),

Schellander ve arkadaşları (30) ve Saeki ve arkadaşlarının (29) bulgularına benzerlik gösterdiği ancak Younis ve arkadaşlarının (39) bulgularından farklı olduğu görülmektedir. Bu farklılığın, kullanılan maturasyon vasatının bileşiminin farklı olmasından veya araştırmacıların kullandıkları FCS'nin farklı ticari preparat olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada elde edilen ortalama fertilizasyon oranları yönüyle de, Saeki ve arkadaşlarının (29) bulgularına büyük oranda benzediği; Fukui ve Ono (12), Matsui ve arkadaşları (24), Birler ve arkadaşları (4) ve Tekin ve arkadaşlarının (35) bulgularından yüksek olduğu ancak, Schellander ve arkadaşları (30), Chian ve arkadaşlarına (9) göre düşük kaldığı gözlenmektedir.

Elde edilen fertilizasyon oranlarının düşük kalmasının nedeni, kullanılan spermatozoa kapasitasyon ve fertilizasyon tekniklerinin, vasat bileşimlerinin farklı olmasına bağlanmaktadır. Aynı şekilde fertilizasyon oranlarının bazı bildirimlere göre yüksek olması da in vitro fertilizasyon tekniklerinin, maturasyon vasatı çeşit ve bileşimlerinin birbirine göre üstünlükleri olduğunu düşündürmektedir.

Ayoub ve Hunter (1), partenogenetik bölünmelerin in vitro olarak üretilen embriyolardan elde edilen gebelik oranlarının düşük olmasının bir nedeni olabileceğini ifade etmektedirler. Partenogenetik bölünmelerin, oosit maturasyon şartlarından etkilenmediğini bununla birlikte fertilizasyon kültüründen ve embriyo kültür şartlarından etkilendiğini kaydetmişlerdir. Söz konusu araştırmacılar partenogenetik bölünme oranlarının tespit edilmesi amacıyla, farklı bileşimlerde, TCM-199, TLP ve SOF kullanmışlar ve yaptıkları çalışmada; %3.9 ile %40.7 arasında partenogenetik bölünme saptamışlardır. Araştırmacılar, maturasyon vasatı olarak TCM-199'un kullanıldığı gruplarda diğer gruplara göre en düşük

partenogenetik bölünme oranlarına ulaşmışlardır.

Bu çalışmada, ortalama %4.53 oranında partenogenetik bölünme oranı elde edilmiş olup bu oran, Ayoub ve Hunter'ın (1) bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada, kaliteli oositlerin kullanılmasıyla tatminkar düzeyde maturasyon ve fertilizasyon oranları elde edilebileceği, mezbahadan toplanan ovaryumların oosit kaynağı olarak laboratuvar şartlarında embriyo elde edilmesi amacıyla kolaylıkla kullanılabilirliği kanısına varılmıştır.

İnek oositlerinin in vitro maturasyonunda TCM-199 vasatının başarıyla kullanılarak, bu vasata yapılan katkılarla maturasyon oranının artırılabilirliği, ECS ve FCS katkılarının her ikisinin de maturasyon başarısının desteklenmesi amacıyla %10 ve %20 düzeylerinde kullanılabilirliği ve birbirine in vitro maturasyon başarısı konusunda üstünlükleri olmadığı bunun yanı sıra, maturasyon ortamına FCS'nin %10 ve %20 oranlarında katılmasının ECS'ye göre; düşük düzeyde fertilizasyon olma şansı sağladığı sonucuna varılmış ve ECS'nin FCS'ye göre daha ekonomik olduğu gibi inek oositlerinin in vitro maturasyon ve fertilizasyonunda destekleyici unsur olarak başarıyla kullanılabilirliği görülmüştür.

Bu çalışmada, sığır embriyosu elde etmede sorun olan partenogenetik aktivasyonun düşük derecede tutmak için %10 ve %20 oranlarında kullanılan serumun uygun dozlarda olduğu, embriyo kültür ortamında CR1aa ile %5 CO₂ ve 38.5 °C sıcaklığın kültür başarısı sağladığı, 100 µl hacminde mikrodamlar içerisine 20 oosit konulmasının oositlerde uygun gelişim ortamı oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

Bu konudaki araştırmaların, mutlaka takım çalışması gerektirdiği, el becerisi gelişmiş, uyumlu bir ekiple çok daha iyi

sonuçlar alınabileceği, in vitro ortamda oositlerin maturasyonu, fertilizasyonu konusunda araştırılması gereken pek çok yönün bulunduğu, yenilenen çalışmalarla bu konunun daha da geliştirilebileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Ayoub MA, Hunter AG** (1993). Parthenogenetic activation of in vitro matured bovine oocytes. *J. Dairy Sci.* 76: 421-429.
2. **Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL** (1984). Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *J. Dairy Sci.* 67: 2775-2785.
3. **Bavister BD, Rose TAH, Pinyopummintr T** (1992). Development of in vitro matured / in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. 37 (1): 127-146.
4. **Birler S, Pabuççuoğlu S, Alkan S, Evecen M, İleri İK** (1997). Sığır oositlerinin in vitro fertilizasyonu üzerine farklı medyumların ve bu medyumlara yapılan hormon ilavelerinin etkileri. *İst. Ü. Vet. Fak. Derg.* 23 (2): 511-516.
5. **Brackett BG, Seidel GE, Seidel SM** (1981). Application of In vitro Fertilization in: *New Technologies in Animal Breeding*. Academic pres Inc. New York, USA.
6. **Brackett BG, Zuelke KA** (1993). Analysis of factor involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 43-64
7. **Brantmeier SA, Bellin ME, Boehm SK, Bushmeyer SM, Kubajak CL, Dentline MR, Grummer RR, Ax LA** (1987). Influence of stage of cycle corpus luteum location follicle size and number of large follicles on estradiol 17- β concentration in bovine follicles. *J. Dairy Sci.* 70: 2138-2144.
8. **Brewis IA, Wong CH** (1999). Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *J. Reprod. Fert.* 4: 135-142.
9. **Chian RC, Okuda K, Niwa K** (1995). Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. *Anim Reprod. Sci.* 38: 37-48.
10. **Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR** (1998). Mechanism of estrogen action: Lessons from the estrogen receptor-knockout mouse. *Biology of Reprod.* 59: 470-475.
11. **Dong YJ, Varisanga MD, Mtango NR, Aono M, Otoi T, Suzuki T** (2001). Improvement of the culture conditions for in vitro production of cattle embryos in a portable CO₂ incubator. *Reprod. Dom. Anim.* 36: 313-318.
12. **Fukui Y, Ono H** (1989). Effects of sera, hormones and granulose cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Rerod. Fert.* 86: 501-506.
13. **Gordon I** (1994). *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cab international Co., Wallingford UK.
14. **Hamano S, Kuwayama M** (1993). In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*, 39: 703-712.
15. **Hosoe M, Shioya Y** (1997). Distrubution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote*, 5: 371-376.
16. **Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N** (1995). *Manual of Bovine Embryo Transfer*. National Livestock Breeding Centre press JLTA, Shirakawa, Japan.
17. **Kato H, Iritani A** (1993). In vitro fertilization in cattle. *Molecular Reprod. Develop.* 36: 229-231.
18. **King GJ** (1993). Fertilization, Pregnancy and Parturition in *Bovine Artificial Insemination Technical Manual*. Ed.: Penner P. Second edition. CAAB, Ontario, Canada.
19. **Kojima T** (1999). Embryo transfer (ET) in cattle-theory and practice- National Livestock Breeding Centre pres, Shirakawa, Japan.
20. **Krisher RL, Bavister BD** (1998). Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, 49: 103-114.
21. **Liu JM, Jin ZQ, Zhao XX, Zhu YD** (1991). The development of bovine follicular oocytes matured in different culture media. *Veterinary Research Communications* 15: 257-260.
22. **Marquant BL, Humblot P** (1998). Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. *Theriogenology*, 49: 3-11.
23. **Martin CR** (1976). *Textbook of Endocrine Physiology*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, USA.
24. **Matsui M, Takahashi Y, Hishunuma M, Kanagawa H** (1995). Effects of supplementation of the maturation media with insulin on in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Jpn. J. Vet. Res.* 43 (3-4): 145-153.
25. **Mayes M** (2002). The meiotic arrest of bovine oocytes. Département des sciences animales Faculte des sciences de l'agriculture et de l'alimentation Universitélaval Québec Doktora tezi. De l'Université Laval, Quebec-Canada.
26. **Mc Donald LE** (1989). *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Ed.: Mc Donald L.E., fourth edition. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
27. **Ocana JMQ, Pinedo MM, Moreno MM** (1999a). Influence of follicle size, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 51: 667-672.
28. **Ocana JMQ, Pinedo MM, Moreno MM** (1999b). The effect of different sera and bovine serum albumen fraction (BSA) on in vitro maturation of immature bovine oocytes. *Arc. Zootec.* 48: 167-174.

- 29. Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL** (1991). In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.* 44: 256-260.
- 30. Schellander K, Fuhrer F, Brackett BG, Korb H, Schleger W** (1990). In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplement with estrous cow serum. *Theriogenology*, 33(2): 477-485.
- 31. Shioya Y** (1993). Calf production by in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. *JARQ* 26 (4): 287-293.
- 32. Sungur H, Yuraydın N** (1991). Çiftlik hayvanlarında oosit maturasyonu ve in vitro fertilizasyon. *Lalahan Hay. Arş. Ens. Derg.* 31 (3-4): 67-77.
- 33. Swenson MJ** (1984). *Duke's Physiology of Domestic Animals*. Ed.: Swenson M.J. Tenth edition. Cornell University press, London, England.
- 34. Takagi Y, Mori K, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J** (1992). Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *J. Anim. Sci.* 70: 1923-1927
- 35. Tekin N, Daşkın A, Akçay E** (2001). Boğa spermatozoonlarının in vitro kapasitasyonu ve fertilizasyonu. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 25: 349-358.
- 36. Ün M, Küplülü Ş** (2003). The effects of follicle diameter on the in vitro fertilization capacity of bovine oocytes aspirated from the slaughtered ovaries. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 50: 203-207.
- 37. Van Soom A, Kruif A** (1998). Bovine embryonic development after in vivo and in vitro fertilization. *Reprod. Dom. Anim.* 33:261-265.
- 38. Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH, Schultz GA** (1991). Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Molecular Reprod. Develop.* 30: 330 - 338.
- 39. Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA** (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Research*, 23: 189-201.