

## SİĞIRLARDA OVUM PICK-UP (OPU) TEKNİĞİ KULLANILARAK İN VİTRO EMBRİYO ÜRETİMİ\*

### In vitro Embryo Production of Cattle by Ovum Pick up (OPU) Technique

Numan AKYOL<sup>1</sup> Sedat Hamdi KIZIL<sup>1</sup> Tahir KARASHAHİN<sup>1</sup> Muharrem SATILMIŞ<sup>1</sup> Yutaka HASHIYADA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü

<sup>2</sup> National Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba, Ibaraki- Japan

Geliş Tarihi : 20.08.2007

Kabul Tarihi : 13.03.2008

#### ÖZET

Bu çalışmanın amacı, sığır­larda birim zamanda elde edilen embriyo sayısını artırmak için ultrason rehberliğinde oosit toplanması (Ovum pick-up, OPU) yönteminin kullanım imkanlarının araştırılmasıdır. Çalışmada, Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünde barındırılan 3-7 yaş arasında bulunan sekiz baş Siyah Alaca inek oosit vericisi olarak kullanılmıştır. Ultrason rehberliğinde oosit toplamak amacıyla 7.5MHz'lik konveks prob ve aspirasyon iğnesinin birlikte yerleştirilmiş ve sığır­lardaki transvaginal çalışmalar için geliştirilmiş olan özel ekipman kullanılmıştır. OPU uygulamaları, her hayvanda iki eşit periyot halinde ve periyotlar arasında fizyolojik dinlenme süreci bırakılmak kaydıyla düzenli olarak her hafta ve toplam 16 kez gerçekleştirilmiştir. Elde edilen oositlerin *in vitro* maturasyonları için TCM-199 (Tissue Culture Medyum) medyumu, fertilizasyonları için Brackett ve Oliphant (BO) medyumu ile direkt yıkama yöntemi, *in vitro* kültürleri içinse Charles Rosencrans aminoasitli (CR1aa) medyumu kullanılmıştır. Bütün süreçlerde, %5 CO<sub>2</sub>, % 95'in üzerinde bağlı nem ve 38.5°C sıcaklığa sahip inkubator kullanılmıştır. Çalışma boyunca 122 OPU uygulaması gerçekleştirilerek birinci periyotta 565, ikinci periyotta ise 264 olmak üzere toplam 829 foliküle punksiyon yapılmış ve 228 adet oosit elde edilmiş, OPU uygulaması başına ortalama 1.9±0.20 adet oosit toplanmıştır. Bu oositlerin A+B+C kalite olanları *in vitro* embriyo elde etme sürecine alınmış ve 48. saatte ortalama 0.3±0.09 adet embriyo gelişimi kaydedilmiştir. *In vitro* kültür süreci sonunda ise blastosist aşamasına yedi adet embriyo gelmiştir. Bireyler ve periyotlar arasında, tespit edilen ortalama folikül ve oosit sayıları bakımından önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Sonuç olarak, ineklerde gözlenen folikül sayılarının düşük olduğu buna bağlı olarak elde edilen oosit sayısının ve elde edilen embriyo sayısının da arzu edilen düzeyde olmadığı görülmüştür. Bu veriler işığında sığır­larda OPU tekniğinin oosit toplanması amacıyla uygulanabileceği ancak embriyo elde edilmesi için oosit vericilerinin seçimine ve bakım-besleme şartlarının optimal olmasına özen gösterilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler :** Sığır, Oosit toplanması, Ultrason, İn vitro embriyo üretimi

#### SUMMARY

The aim of the study is to investigate the possibilities of ovum pick-up (OPU) technique for increasing the number of embryo production from cattle. Eight Holstein Friesian cows aged between 3-7 years and housed in Lalahan Central Livestock Research Institute were used as oocyte donors. A special attachment designed for transvaginal studies, with 7.5 MHz transducer and aspirating needle apparatus was used for oocytes aspiration from donors. OPU sessions were applied once a week regularly for each donor. The study was divided into two periods. A refreshment season was put between each period for animal resting physiologically. Each donor jointed eight sessions per periods then 16 sessions were done totally during this study. Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) was used for *in vitro* maturation of oocytes. Direct washing method with Brackett and Oliphant medium (BO) was used for *in vitro* fertilization process. Amino acids added Charles Rosencrans (CR1aa) medium was used for *in vitro* culture. Five percent CO<sub>2</sub>, over 95 % of humidity and 38.5°C environmental condition was used in the incubator for oocyte maturation, fertilization, and also embryo culture. Total 122 OPU sessions were realized during this study then 565 follicles at first period and 264 follicles at second period were punctured. Eight hundred twenty nine follicles were aspirated in two periods totally. After the study 228 oocytes were taken from donors. Average number of aspirated oocytes was 1.9±0.20 per OPU session. The A, B, C quality oocytes were put together in *in vitro* culture process after qualification according to cumulus oocytes complex. Average cleavage rate was 0.3±0.09 at 48 hours after fertilization. Seven embryos were reached blastocysts stage during the study. There have been differences statistically between two periods for the number of follicles and each cow. Also each period showed significant difference for aspirated oocytes. As a result, the number of embryos and oocytes were low because the average number of punctured follicles was limited for each cow. But it is the author's belief that OPU technique can be used to provide oocytes from live donor cows. Genetically best donors and proper nutritional and environmental conditions should be selected for OPU sessions.

**Key Words:** Cattle, Oocyte aspiration, Ultrasound, In vitro embryo production

\* Bu alışma TOVAG 104V129 proje numarasıyla TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

## GİRİŞ

Sığır ıslahında amaç, üstün verimli elit hayvanların sürü içerisinde sayılarının artırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda 1980' li yıllardan itibaren süperovulasyonla birlikte embriyo transferi tekniği yoğun olarak kullanılmıştır. Yardımcı üreme teknikleri arasında yer alan bu metotlar sayesinde generasyonlar arası süre göreceli olarak azaltılmakta ve genetik ilerleme hızlandırılmaktadır. Bu bakımdan öncelikle sığırlarda uygulanan ıslah çalışmalarında büyük avantaj sağlamaktadır (1, 11, 12, 31).

Sütçü işletmelerde ultrason kullanımının yaygınlaşmasıyla yetiştirme konusunda büyük aşamalar kaydedilmiş ve günümüzde ultrason rehberliğinde elde edilen oositlerden *in vitro* koşullarda embriyo üretimi uygulanabilir hale gelmiştir (17). İnek ovaryumlarından ultrason rehberliğinde ovum toplanması (Ovum pick-up/OPU); içerisine konveks prob ve aspirasyon iğnesi yerleştirilmiş özel ataçman vasıtasıyla transvaginal olarak girilerek, ovaryumlarda bulunan foliküllere punksiyon yapılması ve içerisindeki immature oositlerin aspirasyonla toplanması şeklinde uygulanmaktadır. Elde edilen immature oositler *in vitro* embriyo elde etme (IVP) sürecine alınarak embriyolar üretilmektedir (39).

Sığırlarda bir yıl içerisinde sınırlı sayıda süperovulasyon uygulanabilmesi, süperovulasyona verilen cevabın çok değişken olması, hormonal uygulamaların ovaryumlarda kistik yapılara neden olmaları sonuçta sınırlı sayıda embriyo ve yavru alınmasına neden olmaktadır. Bu durum araştırmacıları daha etkin yöntemler üzerinde çalışmaya teşvik etmiştir. Bir buzağı doğduğu anda bile, ovaryumlarında ortalama 100-150 bin dışı gamet bulundurmasına rağmen, hayatı boyunca yalnızca 10 yavru verebilmektedir. Geriye kalan oositler östrus siklusları içerisinde atrezi olarak kaybolmaktadırlar (4, 12, 23, 32, 33, 37).

Mezbahadan alınan ovaryumlar kullanılarak embriyo ve gebelik elde edilebilmesine rağmen, bu durum bazı olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir. Bu olumsuzlukların üstesinden gelinmesi amacıyla canlı hayvanlardan oosit toplanması söz konusu olmuş ve bunun ilk tecrübeleri laparaskopi ve laparotomi yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir (22, 28). Ardından ultrasonografi yardımıyla laparaskopi yöntemi denenmiş (10), 1988 yılında ise ilk kez insanlarda uygulanan OPU yöntemi ineklere adapte edilerek kullanılmıştır (35).

Seçilmiş kıymetli donörlerin kullanımına imkan veren önemli bir teknik olan OPU'nun başarı düzeyini, prehormonal uygulamalar, aspirasyon sıklığı ve teknisyen becerisi gibi unsurlar belirlemektedir (1, 6). Ovaryumlardaki yüksek gamet potansiyelinden olabildiğince etkin yararlanma imkanı veren bu teknik sayesinde, bazı fiziksel problemler (ayak kırığı vb) yüzünden ayıklanan hayvanlar ile abnormal serviks ve fimbrial yapışmalar gibi bazı bozukluklara sahip infertil hayvanlardan embriyo elde etme şansı vermektedir. OPU yöntemi, binlerce embriyoya ihtiyaç duyulan bilimsel çalışmalar için iyi bir araç durumundadır (4, 12, 27, 31).

Dünyada 30 yılı aşkın bir süredir hatırı sayılır düzeyde ticari bir unsur durumunda olan embriyo transferi (ET) teknolojisi sayesinde üretilen sığır embriyolarından 2003 yılı verilerine göre dünya genelinde taşıyıcı ineklere 500000'in üzerinde taze veya dondurulmuş embriyo transferi yapılmıştır. Üretilen embriyoların % 15-25 kadarını ise *in vitro* koşullarda üretilmiş embriyolar oluşturmaktadır. Örneğin aynı yıl yalnızca Brezilya'da OPU işlemi ile 267000 oosit toplanmıştır (4, 31, 45). Dünyada inekler üzerindeki OPU çalışmaları ile ülkemizdeki ilk *in vitro* fertilizasyon (IVF) çalışmaları eş zamana denk gelmektedir (28, 44). *İn vitro*

fertilizasyon yöntemi kullanılarak ilk buzağı 1982 yılında, ülkemizde ise 2005 yılında elde edilmiştir (3, 7).

Bu çalışmanın amacı, sığırlardan birim zamanda alınan embriyo sayısını artırmak için OPU yönteminin kullanım imkanlarının araştırılmasıdır. OPU metodu ülkemizde sığırlarda ilk kez uygulanmış olup, IVP tekniğiyle kombine bir şekilde kullanılarak çok sayıda embriyo elde edilmesi imkanı araştırılmıştır.

### MATERYAL VE METOT

Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünde barındırılan 3-7 yaş arasında bulunan, sekiz baş Siyah Alaca inek donör (oosit vericisi) olarak kullanılmıştır. İnekler aynı bakım ve besleme şartlarına tabi tutulmuş, OPU süreci içerisinde ekstra besleme yapılmamıştır. Bireylere hormonal stimülasyon yapıl-

mamış, östrus siklusunun herhangi bir anında uygulamalar başlatılmış ve haftada bir kez olmak kaydıyla aynı işlemler 16 kez tekrarlanmıştır. Çalışma, ilki ilkbahar diğeri sonbahar aylarında olmak üzere iki periyot halinde gerçekleştirilmiştir. Periyodun her birinde her ineğin en az sekiz kez OPU işlemine tabi tutulmasına özen gösterilmiştir.

Ovaryumu gözlemek, folikülleri tespit ve oosit aspirasyonunu gerçekleştirmek ve oositleri toplayıp işlem bitene dek korumak amacıyla; ultrason cihazı (Pie med./Aquila), 7.5MHz dalga boyunda çalışan, konveks prob (R10, endocavity 150°), bu probun ve aspirasyon iğnesinin yerleştirildiği özel prob ataçmanı (Resim 1), vakum pompası (Resim 2) ve su banyosu düzeneğinden oluşan bir sistem kullanılmıştır. OPU işlemleri Kruij ve arkadaşlarının (26) tarif ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir.



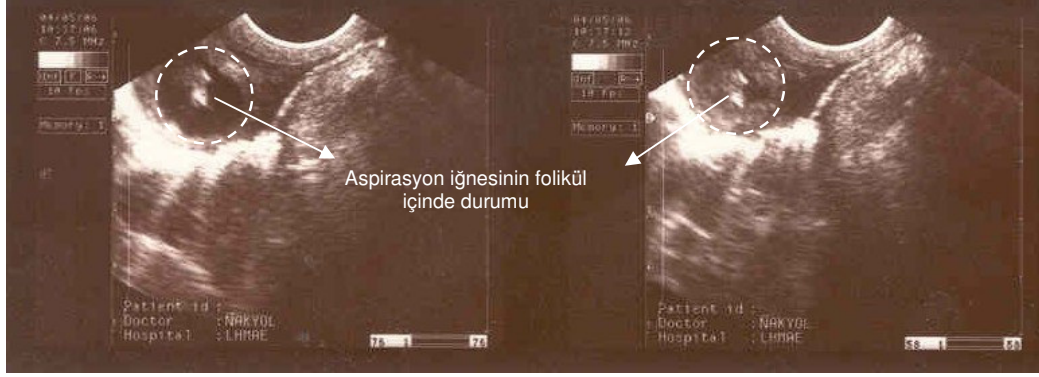
Resim 1. Ultrason cihazı ve prob ataçmanı



Resim 2. Vakum pompası

Hayvanların güvenli bir şekilde çalışma bölgesine alınmasının ardından rektum boşaltılarak perineal bölgenin temizlik ve dezenfeksiyonu ve epidural anestezi uygulanmıştır. Öncelikle foliküllerin yer ve büyüklüklerinin tespit ve kaydının yapılmasının ardından, her iki ovaryum için de vakit

geçirmeden aspirasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. OPU işlemleri Carter ve arkadaşları (12) ile Goto ve arkadaşlarının (21) en uygun olduğunu bildirdikleri sıklıkta yani her bir birey için haftada bir kez ve ardışık olmak üzere tekrarlanmıştır.



Resim 3. Folikül punksiyonu (öncesi ve sonrası)

Aspirasyon, 2-15 mm arasında değişen büyüklükteki foliküllerden gerçekleştirilmiş ve vakum değeri olarak 80-100 mmHg kullanılmıştır. OPU işlemi için 18 G'lik tek kullanımlık enjektör iğneleri tercih edilmiş ve işlemin mümkün olduğunca kısa sürede (30 dk) bitirilmesine özen gösterilmiştir (Resim 3). Aspirasyon işlemi sırasında toplama kanallarının kan pıhtısı ile tıkanmasını önlemek amacıyla 10 IU/ml Heparin (Nevparin5000 / Mustafa Nevzat İlaç San.) + % 1 buzağı serumu (CS) + 100 IU penisilin/ml + 100 µg/ml streptomisin (İ.E. Ulugay) içeren PBS solüsyonu kullanılmıştır. Aspirasyon işlemi bitirildikten sonra 30°C'lik su banyosunda 50 ml'lik tüplerde toplanan aspirasyon sıvısı laboratuvarında süzme işlemine tabi tutulmuş ve her hayvan için farklı bir tüp kullanılmıştır. Bütün *in vitro* maturasyon, fertilizasyon ve kültür süreçleri bireysel etkilerin karışmaması ve sonuçların karşılaştırılabilmesi amacıyla her birey için farklı mikrodamlarda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her oosit için 5 µl medyumla hazırlanmış olan mikrodamlar kullanılmıştır. Kalite değerlendirmeleri, kumulus oosit kompleksinin (COC) durumuna göre A (iyi), B (vasat), C (Kumulussuz) ve D (Dejenere) şeklinde sınıflandırılarak gerçekleştirilmiş ve maturasyon sürecine A+B+C kalite olanlar alınıp dejenere olanlar sürece dahil edilmemiştir (8).

Seçilen kumulus hücrelerine sahip oositler, en az 3 saat önceden 35 mm petripler (Falcon 1008/Dickinson) içerisinde hazırlanarak inkubatörde ekilibre edilmiş olan TCM-199 medyumuna ile birkaç kez yıkanarak maturasyon mikrodamlarına alınmıştır. Maturasyon medyumuna olarak Doku Kültürü Medyumuna (Tissue Culture Medyum) TCM-199 (M7528/Sigma-Aldrich Co.) kullanılmıştır. Medyumuna, 0.1 mg/ml L-Glutamin (G8540/Sigma-Aldrich Co.), %5 CS (Buzağı Serumu) (N4762/Sigma-Aldrich Co.), 100 IU/ml kristalize penisilin-G potasyum ve 100 µg/ml kristalize streptomisin sülfat ilave edilmiştir. Bu işlemlerin ardından 35 mm kültür petriplerinde (Falcon 3001/Dickinson), 100 µl hacimde mikrodamlar hazırlanarak üzerine 4.5 ml mineral yağ (M8410/Sigma-Aldrich Co.) ilave edilmiştir. Hazırlanan bütün maturasyon medyumları, oositler yerleştirilmeden en az 3 saat önceden % 95'in üzerinde bağıl nem ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren 39°C'deki inkubatöre konarak bu inkubasyon ortamında ekilibre olmaları sağlanmıştır. İnek oositlerinin *in vitro* maturasyon işlemi, % 5 CO<sub>2</sub>, % 95'in üzerinde bağıl nem ve 38.5°C'de 22 saatte gerçekleştirilmiştir. İnkubasyon periyodu sonunda kumulus ekspansiyonu görülenler mature kabul edilmiştir.

*In vitro* fertilizasyon amacıyla Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Suni

Tohumlama Laboratuvarında üretilen ve içerisinde  $175 \times 10^5$  spermatozoa bulunan 0.25ml'lik ticari payetlerde dondurulmuş Siyah Alaca ırkı boğa spermaları kullanılmıştır. *In vitro* fertilizasyonda farklılığa meydan vermemek amacıyla, bir boğadan, aynı gün alınarak dondurulan, eşdeğer motiliteye sahip spermalar kullanılmıştır. Kanagawa ve arkadaşlarının (24) tarif ettiği yönteme göre, spermatozoonların kriyoprotektanlar ve seminal plazmadan ayrıştırılması, sulandırılması ve kapasitasyonu amacıyla her birine farklı isim verilen modifiye BO medyumları kullanılmıştır. Kapasitasyon amacıyla 5 IU/ml heparin (H3149/Sigma-Aldrich Co.) ve 2 mM kafein (C4144/Sigma-Aldrich Co.) kullanılmıştır. BO stok solüsyonu-2 kullanılmadan önce CO<sub>2</sub> ile muamele edilerek pH'sının düşmesi sağlanmıştır.

Medyumların her biri, sperma işlenmesinden en az iki saat önce hazırlanarak, Sperm Yıkama Medyumu (SYM) ve Sperm Sulandırma Medyumu (SSM) 35°C'deki su banyosuna, Oosit Yıkama Medyumu (OYM) ise ekilibrasyon amacıyla inkubatöre konmuştur. *In vitro* fertilizasyon amacıyla 35 mm kültür petripleri kullanılmıştır. Öncelikle spermatozoonların yerleştirileceği mikrodamlara, 5 µl OYM ve üzerine 4.5 ml mineral yağ konarak ön hazırlık yapılmış ve bunlarda ekilibrasyon amacıyla inkubatöre kaldırılmıştır. 37°C'deki su banyosunda 20-30 saniyede çözdürülen spermalar (4 adet sperma payeti), 15 ml hacmindeki boş santrifüj tüplerine alınmış, üzerlerine 6 ml SYM ilave edilerek 1800 rpm devirde 5 dk santrifüjden sonra sifon yaptırılarak süpernatantın ayrılmasının ardından işlem tekrarlanmıştır.

Spermatozoonların sayımlarının kolay yapılabilmesi amacıyla sedimentinin üzerine yaklaşık 1 ml SYM ilave edildikten sonra, sayım yapılarak sedimentin içerdiği spermatozoa miktarı bulunmuştur. SYS ve SSM'ler kullanılarak spermatozoonlar sulandı-

rılıp, sayımları Thoma lamı kullanılarak yapılmıştır. Sayım öncesi spermatozoa yoğunluğunu azaltmak amacıyla % 5 NaCl içeren solüsyonla 1/100 oranında sulandırma işlemi yapılarak son yoğunluk,  $6.25 \times 10^6$ /ml spermatozoa olacak şekilde fertilizasyon medyumuna hazırlanmıştır.

SSM ile yaklaşık 30.000 spermatozoa / oosit olacak şekilde son sulandırması yapılan spermatozoonlar fertilizasyon mikrodamlarına alınarak inkubatöre konulmuştur. *In vitro* maturasyonu tamamlanan oositler fertilizasyon için önce OYM ile en az 3 kez yıkandıktan sonra, preinkubasyondan çıkarılan spermatozoonların üzerine her oosit için 5 µl fertilizasyon medyumuna olacak şekilde ilave edilmiş ve sonrasında sonra oositler OYM ile yıkanıp toplam 30 dakika içerisinde fertilizasyon mikrodamlarına yerleştirilmiştir.

Kullanılan sperm işleme metodunda ölü/canlı spermatozoonların ayırımına ihtiyaç duyulmamış ve işlemler sonunda ortalama % 50 motil spermatozoon olmak kaydıyla oosit başına yaklaşık 15000 canlı spermatozoa ile fertilizasyon işlemi, % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkubatörde 5-6 saat içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Embriyoların *in vitro* kültürü için CR1aa medyumuna işlemlerden önce laboratuvarında taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır. *In vitro* fertilizasyon işleminin ardından oositlerin etrafını saran kumulus hücreleri steril cam Pastör pipetleriyle pipetleme işlemi yapılarak uzaklaştırılmış ardından oositler maturasyon sürecinde olduğu gibi mikrodamlara yerleştirilmiştir. Bu işlemden önce oositler, en az 3 saat önceden hazırlanıp inkubatöre kaldırılmış ve içerisinde oositlerin yıkanması amacıyla kültür medyumuna konmuş olan 35 mm'lik normal petriplerde en az 6 kez yıkanarak kalan kumulus hücreleri ve spermatozoonlardan arınmaları sağlanmıştır.

*In vitro* embriyo kültürü amacıyla % 5 CO<sub>2</sub>, % 95'in üzerinde bağıl nem ve 38.5°C

merkezi sıcaklıktaki inkubatör kullanılmıştır. Embriyoların, kültür amacıyla inkubasyona alınmasını takip eden 48. saat ilk bölünme kontrolü yapılmış olup, bölünmeler 2 hücre ve 4 ya da daha yukarı sayıda hücreler şeklinde sınıflandırılmıştır. Embriyo elde edilmesi amacıyla kültür sürecinde mikrodamlar içerisindeki medyumların zaman zaman yenilenmesi yoluna gidilmemiş ve blastosist elde edilmesi için fertilizasyon işleminin tamamlanmasını takip eden 7. güne dek embriyo gelişimleri takip edilmiştir.

İneklerde tespit edilen folikül miktarları, aspire edilen oosit miktarları ve OPU sisteminin işlerliği, elde edilen oositlerin kalite değerlendirmesi ve IVP sisteminde embriyo elde edilme oranları ile sürecin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Sunulan çalışmada, kullanılan ineklerin oosit toplama oranlarının karşılaştırılmasında Khi-kare testi; folikül ve oosit sayısı ile 48. saatte bölünen zigot sayıları bakımından bireylere ait ortalamaların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi; söz konusu özellikler bakımından periyotların karşılaştırılmasında ise eşleşmiş gruplarda t Testi yöntemleri kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çalışma boyunca, 122 OPU işlemi gerçekleştirilmiş olup, birinci periyotta 565, ikinci periyotta ise 264 olmak üzere toplam 829 adet folikül tespit edilmiştir (Tablo 1). Bu foliküllere yapılan punksiyonlar sonucunda, 166 adet A+B kalite, 62 adet ise C+D kalite olmak üzere toplam 228 adet oosit elde edilmiştir. Dolayısıyla OPU işlemleri sonunda elde edilen oositlerin % 72.8'i A+B kalite ve % 27.2 ise C+D kalite oosit şeklinde gerçekleşmiş ve oosit toplama oranı % 27.50 olarak ölçülmüştür. OPU işlemi başına elde edilen ortalama folikül sayısı  $6.8 \pm 0.30$ , ortalama oosit sayısı  $1.9 \pm 0.20$  ve 48. saatte

bölünen zigot sayısı ise  $0.3 \pm 0.09$  olarak tespit edilmiştir.

Çalışma süresince *in vitro* embriyo elde etme sürecine alınan 166 adet A+B kalite oositlerden 48. saatte bölünen zigot sayısı birinci periyotta 29 adet, ikinci periyotta 12 adet olmak üzere toplam 41 adet olarak tespit edilmiştir. Buna göre her OPU işlemi başına 48. saatte bölünen zigot oranı % 29.7 iken, kültür sürecine alınanlar göz önüne alındığında bu oran % 40.4 olarak hesaplanmıştır. Birinci periyotta yedinci gün yedi adet embriyo gelişimi gözlenirken, ikinci periyotta yedinci günde blastosist aşamasında embriyo gelişimi izlenmemiştir. Yedinci gün elde edilen embriyo miktarları çok düşük olduğundan istatistik değerlendirmeye alınmamıştır (Tablo 2).

Deneme süresince bireylerde en fazla 143 folikül, 43 oosit; en az 66 folikül ve 11 oosit tespit edilmiştir. Ortalama folikül sayıları açısından bireylere göre en çok 8.9 en düşük 4.1 folikül gelişimi hesaplanmıştır. Bireylere göre ortalama oosit sayıları açısından ise en yüksek 2.7 ve en düşük 0.7 bulunmuştur. Aynı şekilde 48. saatte bölünen zigot ortalamalarında ise en yüksek 1.3, en düşük 0.1 olarak bulunmuştur. Yedinci gün embriyo gelişimi bakımından kimi bireylerde üç blastosist aşamasında embriyo gelişimi kaydedilirken kimi bireylerde hiçbir embriyo gelişimi olmamıştır.

Çalışma boyunca elde edilen folikül sayıları bakımından birey ortalamaları arasındaki farkların istatistik olarak önemli olduğu görülmüştür ( $P < 0.01$ ). Toplanan oosit ve 48. saatte bölünen zigot sayıları bakımından birey ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemsizdir ( $P > 0.05$ ). Tablo 1'de görüldüğü gibi bir birey dışında bütün bireylerde OPU işlemi 16 kez gerçekleştirilmiştir.



Tablo 1. Bireylere göre elde edilen OPU bulguları

İnek	OPU işlemi (n)	Tespit edilen folikül (n)	Ortalama Folikül ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )	Toplam oosit (n)	Oosit toplama oranı (%)	Ortalama Oosit ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )	48. saatte bölünen zigot (n)	Ortalama bölünen zigot ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )
A	16	118	7.4±0.88	42	35.59	2.6±0.64	4	0.3±0.19
B	16	106	6.6±0.60	29	27.36	1.8±0.40	4	0.3±0.11
C	10	89	8.9±1.24	31	34.83	3.1±1.14	13	1.3±0.84
D	16	66	4.1±0.55	11	16.67	0.7±0.28	1	0.1±0.06
E	16	87	5.4±0.62	21	24.14	1.3±0.34	1	0.1±0.06
F	16	100	6.3±0.90	27	27.00	1.7±0.51	5	0.3±0.15
G	16	120	7.5±0.70	24	20.00	1.5±0.37	3	0.2±0.10
H	16	143	8.9±0.91	43	30.07	2.7±0.73	10	0.6±0.26
Genel	122	829	6.8±0.30	228	27.50	1.9±0.20	41	0.3±0.09
P			**		*	-		-

- : P>0.05; \*, P< 0.05; \*\*,P<0.01

Tablo 2. Periyotlara ve bireylere göre elde edilen OPU bulguları

	İnek	OPU işlemi (n)	Folikül (n)	Ortalama folikül ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )	Toplam oosit (n)	Ortalama Oosit ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )	48. saat bölünen zigot (n)	Ortalama bölünen Zigot ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )	Blastosist (n)
1. Periyot	A	8	73	9.1±1.33	26	3.3±1.11	4	0.5±0.38	1
	B	8	67	8.4±0.63	19	2.4±0.65	2	0.3±0.16	2
	C	8	81	10.1±1.13	30	3.8±1.33	13	1.6±1.03	0
	D	8	44	5.5±0.65	8	1.0±0.50	0	0.0±0.00	0
	E	8	59	7.4±0.63	13	1.6±0.63	1	0.1±0.13	0
	F	8	71	8.9±0.99	21	2.6±0.87	3	0.4±0.26	3
	G	8	74	9.3±0.94	18	2.3±0.56	2	0.3±0.16	1
	H	8	96	12.0±0.65	30	3.8±1.33	4	0.5±0.38	0
Genel		64	565	8.8±0.38 <sup>a</sup>	165	2.6±0.33 <sup>a</sup>	29	0.5±0.16	7
2. Periyot	A	8	45	5.6±0.84	16	2.0±0.65	0	0.0±0.00	0
	B	8	39	4.9±0.55	10	1.3±0.41	2	0.3±0.16	0
	C	2	8	4.0±2.00	1	0.5±0.50	0	0.0±0.00	0
	D	8	22	2.8±0.56	3	0.4±0.26	1	0.1±0.13	0
	E	8	28	3.5±0.42	8	1.0±0.27	0	0.0±0.00	0
	F	8	29	3.6±0.73	6	0.8±0.31	2	0.3±0.16	0
	G	8	46	5.8±0.56	6	0.8±0.31	1	0.1±0.13	0
	H	8	47	5.9±0.64	13	1.6±0.46	6	0.8±0.37	0
Genel		58	264	4.6±2.05 <sup>b</sup>	63	1.1±1.19 <sup>b</sup>	12	0.2±0.52	0

<sup>a,b</sup> : Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan periyot ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (P<0.05)





Genel anlamda ikinci periyotta elde edilen ortalamalar birinci periyotla kıyaslandığında düşük olduğu görülmektedir (Tablo 2). Ancak, ikinci periyotta tespit edilen folikül ve toplanan oosit miktarlarında sayısal bir düşüş izlenmesine rağmen bu düşüş istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Periyotlarda elde edilen folikül ve toplanan oosit ortalamalarına ait istatistik analiz sonucunda periyot ortalamaları arasında, birinci periyot lehine önemli derecede fark tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Ancak 48. saatte bölünen ortalama zigot bakımından farklılık gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ).

### TARTIŞMA

Araştırmacılar, elde edilen oosit ve embriyo sayısının OPU işlem sıklığından etkilendiğini ancak en uygun oosit toplama sıklığının haftada iki kez olmak kaydıyla üç aya kadar veya haftada bir kez olmak kaydıyla beş aya kadar olan tekrarlar olduğunu bildirmişlerdir (1, 12, 21, 25, 36). OPU çalışmalarına, hayvan refahı açısından bakan Maillard ve arkadaşları (29), hayvanların OPU uygulamaları sebebiyle acı çekeceği ve bazı lezyonların oluşabileceği yönünde endişe ettiklerini ve bu sebepten dolayı OPU uygulamalarına sıcak bakmadıklarını bildirmişlerdir. Anılan araştırmacılar OPU işlemleri sırasında kan kortizol seviyesinin yükseldiğini ve hayvanların strese girdiklerini belirtmişlerdir. Sunulan bu çalışmada, OPU işlemleri haftada bir kez gerçekleştirilmiş olup arada beş aylık bir dinlenme periyodu dışında toplam dört ay sürdürülmüştür. Bahsi geçen süreç içerisinde hayvanlarda herhangi bir patolojik bulgu gözlenmemiş hatta farklı bir sebepten dolayı mecburi kesime tabi tutulan bir hayvanda vagina duvarı ve ovaryumlara yapılan dış bakıda yalnızca ovaryum tunica albuginea-sında birkaç punksiyon izinden başka hiçbir deformasyon ve adhezyon olgusu görülmemiştir. Bahsedilen bulguların Goto ve

arkadaşlarının (21) bulguları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

OPU çalışmalarında elde edilen folikül sayısı, hayvanların yaşlarına, ırklarına, hormon uygulamalarına ve beslenmelerine bağlı olarak değişmekte ve ortalama 4.5 ile 24.9 arasında değişmektedir (2, 14, 21, 26, 30, 38, 41). Sunulan çalışmada 2-15 mm çapındaki foliküllerden aspirasyonla oosit toplanmış ve anılan büyüklükteki bütün foliküllerden toplanan oositler folikül büyüklüğüne göre sınıflandırılmaksızın sürece dahil edilmiştir. İlk periyot çalışmalarında ortalama 8.8, ikinci periyot çalışmalarında ise ortalama 4.4 folikül tespit edilmiştir. Çalışma genelinde ise ortalama 6.8 folikül saptanmış ve tamamına punksiyon yapılmıştır. Bu araştırmanın bulguları adı geçen araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara benzerlik göstermektedir. Ancak ortalamanın 6.8 folikül olmasının muhtemel sebepleri olarak, hayvanların yaşı, çevresel koşullar ve genetik faktörler düşünülmüştür. Kimi araştırmacıların (16, 39, 46) belirttikleri gibi, ineklerde ek yemleme yapılmamış olması sonucunda gelişmesi muhtemel negatif enerji dengesi yüzünden folikül gelişimlerinin olumsuz etkilenmiş olabileceği de düşünülmüştür.

Bols ve arkadaşlarına (6) göre, ovaryumda gözlenen foliküllerin % 42'sinden, Carter ve arkadaşlarına (12) göre ise % 60-70'ine punksiyon yapılarak ortalama 3-10 oosit toplanabilmektedir. OPU işlemi ile oosit toplama oranı oldukça farklılık göstermektedir. Araştırmacılar birey başına ortalama 1.6-14 arasında oosit toplanabildiğini bildirmişlerdir (20, 27, 40). Galli ve arkadaşları (19), OPU ile elde edilen oosit sayısının ortalama 10-12 olduğunu ve *in vitro* embriyo elde edilmesi açısından bakıldığında bu miktarın düşük olduğunu vurgulamaktadırlar. Oosit toplama oranının ise % 7-79 arasında geniş bir varyasyon gösterdiği belirtilmektedir (6, 14, 30). Kruij ve arkadaşları (26), OPU

uygulamaları ile birlikte ilk üç aylık dönemde folikül gelişiminde bir miktar artış olmasına rağmen oosit toplama oranının düştüğünü haber vermişlerdir. Araştırma sonuçları incelendiğinde elde edilen A+B kalite oositlerin, C+D kalite oositlere oranına göre düşük veya eşit oldukları görülmüştür (14, 15, 23, 30).

Sunulan çalışmada elde edilen ortalama oosit sayısı 1.9, periyotlar göz önüne alındığında ise ilk periyotta 2.6, ikinci periyotta ise 1.1 olarak saptanmıştır. Çalışma boyunca oosit toplama oranı ise % 27.5 olarak gerçekleşmiştir. Toplanan oosit bakımından değerler, anılan araştırmacıların değindiği en düşük bulgulara yakın; oosit toplama oranı olarak ise adı geçen değerler arasında bulunmuştur. Bu bulguların düşük olmasının muhtemel sebebi olarak teknik elemanların yeterince tecrübe sahibi olmayışları, OPU işlemi için kullanılan iğne uç kesitinin uzun olmasının da küçük foliküllerden oosit aspirasyonunda sorun oluşturduğu ve bu sorunun giderilmesi amacıyla daha kısa uç kesitine sahip iğnelerin kullanılması gerektiği düşünülmüştür. Elde edilen oosit kalitesi bakımından ise Manik (30), Diez (14), Faber ve arkadaşlarının (15) bulgularının aksine iyi kalite oosit sayısı daha yüksek bulunmuştur. Bunun muhtemel sebebi olarak oosit değerlendirme ve sınıflandırma kriterlerinin farklılığı ve bu değerlendirmelerin subjektif olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. İkinci OPU periyodunda toplanan oosit miktarlarının düşük olmasının bir sebebini de Kruij ve arkadaşlarının (26) belirttikleri şekilde açıklamak mümkündür. Ancak sunulan çalışmada ikinci OPU periyodunda anılan araştırmacıların belirttiklerinin aksine folikül miktarında artış kaydedilmemiştir. Dolayısıyla arada dinlenme periyodu bırakılması ile bireylerden elde edilen oosit sayısında artış olmamıştır.

Taka ve arkadaşları (42), *in vitro* koşullarda embriyo gelişimlerinin; kültür

ortamlarının kombinasyonlarından, ortamın oksijen ve karbondioksit oranlarından ve hangi sayıda embriyonun birlikte kültüre alındığından yani ortamdaki embriyo sayısından etkilendiğini bildirmektedirler. Brum ve arkadaşları da (9), kültür koşullarının optimum olmasının yanı sıra oosit ve embriyoların grup halinde bir arada bulunmasının önemine vurgu yaparak 5 yerine 10 veya 20 oosit veya embriyonun bir arada kültüre edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Manik ve ark A+B kalite oositlerden elde edilen bölünme (cleavage) oranının C+D kalite oositlere göre daha yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Araştırmalara göre *in vitro* koşullarda elde edilen bölünme oranları % 0-70 arasında; blastosist aşamasında embriyo elde edilme oranı ise % 0-52 arasında geniş bir varyasyon göstermektedir (14, 21, 30, 38, 40, 47). Bu varyasyonun sebebi olarak IVF teknolojisinde kullanılan embriyo üretim protokollerinin henüz tam olarak optimize edilemediği ve arzu edilen düzeyde embriyo gelişimi için yetersiz kaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar birkaç boğaya ait spermaların karıştırılarak kullanılmasının dahi sorunu çözmediğini vurgulamışlardır (5, 13, 26). Örneğin bazı boğaların spermaları *in vitro* embriyo üretim prosedüründe sperm işleme protokollerine cevap vermemektedirler veya bu tür spermalardan çok düşük fertilizasyon sonuçları alınmaktadır (26). Taneja (43) OPU sonucu elde edilen 100 oositten 30 kadar *in vitro* embriyo elde edilebileceğini; Fujita ve arkadaşları (18) ise OPU sonucu elde edilen embriyo ortalama sayısının her bir OPU işlemi için üçün altında olduğunu belirtmişlerdir. Nolan ve arkadaşları (34), oosit toplama sıklığının elde edilen embriyo oranını etkilediğini, bireysel farklılığında embriyo elde edilmesinde önemli bir faktör olduğunu belirterek ilk dört uygulama sonucunun bireyin embriyo üretme yeteneğinin bir göstergesi olabileceğini, bu aşamada düşük embriyo elde edilen bir bireyden sonraki OPU

çalışmalarında da büyük olasılıkla düşük miktarda embriyo elde edileceğini ancak ek yemleme yapılarak bu oranın artırılmasının mümkün olabileceğine vurgu yapmaktadırlar.

Sunulan bu çalışmada, 48. saatte ortalama 0.3 embriyo gelişimi kaydedilmiş ve ilk periyotta blastosist aşamasına gelen embriyo miktarının çok düşük seviyede kaldığı ve embriyoların taşıyıcı hayvanlara transfer edilecek kadar kaliteli olmadıkları, ikinci periyotta blastosist aşamasında embriyo alınmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, ineklerde gözlenen folikül sayılarının düşük olduğu buna bağlı olarak elde edilen oosit sayısının ve elde edilen embriyo sayısının da arzu edilen düzeyde olmadığı görülmüştür. Buna rağmen donörlerden oosit toplanması amacıyla OPU tekniğinin uygulanabileceği ancak embriyo elde edilmesi için reproduktif performansı uygun donör kullanılması ve başta besleme olmak üzere çevresel koşulların optimize edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

#### KAYNAKLAR

1. **Abdoon ASS** (2005) *Factors affecting In vitro production of bovine embryos*. (<http://esarf2.tripod.com/abdoon.htm>). Erişim tarihi: 12.08.2005).
2. **Adamiak DJ, Mackie K, Watt RG, Webb R, Sinclair KD** (2005) *Impact of Nutrition on Oocyte Quality: Cumulative Effects of Body Composition and Diet Leading to Hyperinsulinemia in Cattle*. *Biology of Reproduction*, 73, 918-926.
3. **Akyol N, Kızıl SH, Karashahin T** (2005) *In vitro Sığır Embryosu Üretimi*, 14. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, 31 Ağustos- 2 Eylül, Sayfa no: 244-8, Eskişehir.
4. **Betteridge KJ** (2004) *New Reproductive Technologies in Cattle: A Veterinary Perspective*. *23rd World Buiatrics Congress*, Quebec-Canada.
5. **Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA** (2002) *Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes*. *Biology of Reproduction*, 66, 38-43.
6. **Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A, Kruif Ade** (1995) *Transvaginal Ovum Pick-up (OPU) in the Cow: A New Disposable Needle Guidance System*. *Theriogenology*, 43, 677-687.
7. **Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA** (1982) *Normal Development Following In vitro Fertilization in the Cow*. *Biology of Reproduction (Abstract)* 27, 147.
8. **Brackett BG, Zuelke KA** (1993) *Analysis of factor involved in the In vitro production of bovine embryos*. *Theriogenology*, 39: 43-64.
9. **Brum DS, Leivas FG, Silva CAM, Rubin MIB, Rauber LP, Fialho SS, Pilla LFC, Bernardi ML** (2005) *The Effects of the Number of Oocytes and the Volume of Maturation Medyum in Bovine In vitro Embryo Production*. *Anim. Reprod.* 2:1, 70-73.
10. **Callesen H, Greve T, Christensen F** (1987) *Ultrasonically Guided Aspiration of Bovine Follicular Oocytes*. *Theriogenology*, 27, 217.
11. **Callesen H, Liboriussen T, Greve T** (1996) *Practical Aspects of Multiple Ovulation-Embryo Transfer in Cattle*. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 215-226.
12. **Carter JA, Bellow S, Meintjes M, Perez O, Ferguson E, Godke RA** (2002) *Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Aspiration for Production of Embryos In vitro*. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 45:1, 99-108.
13. **Cecconi S** (2002) *Growth and Differentiation of Small Ovarian Follicles in Mammal: Problems and Future Perspectives*. *J. Reprod. Dev.*, 48, 431-445.
14. **Diez CHC, Doque P, Prendes JM, Rodriguez A, Goyache F, Fernandez I, Facal N, Ikeda S, Alonso-Montes C, Gomez E** (2005) *Oocytes Recovered from Cows Treated with Retinol Become Unviable as Blastocysts Produced In vitro*. *Reproduction*, 129, 411-421.
15. **Faber DC, Ferre LB**, (2006) *Advancements in Reproductive Technology in Cattle*, (<http://www.beefimprovement.org/proceedings/04proceedings/faber.pdf>). Erişim Tarihi: 09.12.2006).
16. **Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller DJ, Watkins AJ, Eckert JJ** (2004) *The Embryo and Its Future*. *Biology of Reproduction* 71, 1046-1054.
17. **Fricke PM** (2002) *Scanning the Future-Ultrasonography as a Reproductive Management Tool for Dairy Cattle*. *J. Dairy Sci.*, 85, 1918-1926.
18. **Fujita T, Umeki H, Shimura H, Kugumiya K, Shiga K** (2006) *Effect of Group Culture and Embryo-Culture Conditioned Medyum on Development of Bovine Embryos*. *J. Reprod. Dev.*, 52, 137-142.
19. **Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G** (2001) *Embryo Production by Ovum Pick up from Live Donors*. *Theriogenology*, 55, 1341-1357.
20. **Goto K, Tanimoto Y, Ookutsu S, Nakanishi Y, Yanagita K, Kubota C, Kajisa O, Kawabata K, Yokoyama K, Inohae S** (1995a) *Birth of Calves Derived from oocytes Collected by Transvaginal Ultrasound Guided Follicular Aspiration*. *J. Reprod. Dev.* 41, 171-174.

- 21. Goto K, Tanimoto Y, Fuji W, Taniguchi S, Takeshita K, Yanagita K, Ookutsu S, Nakanishi Y** (1995b) *Evaluation of Once-Versus Twice-Weekly Transvaginal Ultrasound-Guided Follicular Oocyte Aspiration With or Without FSH Stimulation from the Same Cows*. J. Reprod. Dev., 41, 303-309.
- 22. Holland EJ, Bindon BM, Piper LR, Thimonier J, Cornishch KA, Radford HM** (1981) *Endoscopy in Cattle: Theqhniques for Ovarian Examination by the Paralumbar and Midventral Routes*. Anim. Reprod. Sci. 4, 127-135.
- 23. Izumi T, Sakakida S, Nagai T, Miyamoto H** (2003) *Allometric Study on the Relation Between the Growth of Preantral and Antral Follicles and That of Oocytes in Bovine Ovaries*. J. Reprod. Dev., 49, 361-368.
- 24. Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N** (1995) *Manual of Bovine Embryo Transfer*. National Livestock Breeding Centre press JLTA, Shirakawa, Japan.
- 25. Kruip TAM, Boni R, Roelofsen MWM, Wurth YA, Pieterse MC** (1993) *Application of OPU for Embryo Production and Breeding in Cattle*. Theriogenology, (Abstract), 39, 251.
- 26. Kruip TAM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pieterse MC** (1994) *Potential Use of Ovum Pick-up for Embryo Production and Breeding in Cattle*. Theriogenology, 42, 675-684.
- 27. Konishi M, Aoyagi Y, Takedomi T, Itakura H, Itoh T, Yazawa S** (1996) *Production and Transfer of IVF Embryos from Individual Inhibin-Immunized Cows by Ultrasound-Guided Transvaginal Follicular Aspiration*. J. Vet. Med. Sci. 58:9, 893-896.
- 28. Lambert RD, Bernard C, Rioux JE, Be Land R, D'Amours D, Montreuil A** (1983) *Endoscopy in Cattle by the Paralumbar Route: Technique for Ovarian Examination and Follicular Aspiration*. Theriogenology, 20, 149-161.
- 29. Maillard SC, Quinton H, Lauffenburger J, Lefort NC, Richard C, Marchal J, Mormede P, Renard JP** (2003) *Consequences of Transvaginal Follicular Puncture on Well-Being in Cows*. Reproduction, 125, 555-563.
- 30. Manik RS, Singla SK, Palta P** (2003) *Colection of Oocytes Through Transvaginal Ultrasound-Guided Aspiration of Follicles in an Indian Breed of Cattle*. Anim. Reprod. Sci., 76:(3-4), 155-161.
- 31. Mapletoft RJ, Hasler JF** (2005) *Assisted Reproductive Technologies in Cattle: A Review*. Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. 24:1, 393-403.
- 32. Miyano T** (1999) *In vitro Growth of Mammalian Oocytes*. J. Reprod. Dev. 51, 169-176.
- 33. Nagai T** (1999) *In vitro fertilization in cattle and pigs*. Tohoku National Agricultural Experiment Station press, Iwate, Japan.
- 34. Nolan R, Duffy P, Wade M, Callaghan DO, Boland MP** (1998) *Effect of Quantity and Type of Diet and Frquency of Transvaginal Ovum Aspiration on In vitroEmbryo Development in Heifers*. Theriogenology, 1: 49, 402.
- 35. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TAM, Tavere MAM** (1988) *Aspiration of Bovine oocytes During Transvaginal Ultrasound Scanning of the Ovaries*. Theriogenology, 30, 751-762.
- 36. Ribadu AY, Naka T** (1999) *Bovine Reproductive Ultrasonography: A Review*. J. Reprod. Dev., 45, 13-28.
- 37. Roschlau K, Kuwer A, Roschlau D, Kuhnt C, Johannng S, Poppe P, Michaelis U, Dexne U** (2003) *OPU and IVP Increase the Efficiency of Embryo Transfer Programmes in the Bovine: Five Years Practical Experience*. Association Europeenne de Transfert Embryonnaire Newsletter Number:18, 2-5.
- 38. Santl B, Sauwein H, Daxenberger A, Wenigerkind H, Stojkovic M, Wolf E** (1998) *Oocyte Collection in Cattle: Is There a Correlation Between Yield of Oocytes and Serum Insulin-Like Growth Factor-1 Levels*. Theriogenology (Abstract), 1: 49, 403.
- 39. Sasamoto Y, Sakaguchi M, Nagano M, Katagiri S, Takashi Y** (2004) *Follicular Development After Ovum Pick-up and Fertilizability of Retrieved Oocytes in Postpartum Dairy Cattle*. Vet. Res. 51: (3-4), 151-159.
- 40. Schernthaner W, Wenigerkind H, Stojkovic M, Palma GA, Mödl J, Wolf E, Brem G** (1999) *Pregnancy Rate After Ultrasound-Guided Follicle Aspiration in Nonlactating Cows from Different Breeds*. J. Vet. Med., (Abstract), 46,33.
- 41. Seneda MM, Esper CR, Andrade ER, Binelli M, Max MC, Olivera JA, Garcia JM** (2005) *Relationship Between Follicle Size After FSH Treatment and Efficiency of Oocyte Recovery*. Anim. Reprod., 2:3, 178-182.
- 42. Taka M, Iwayama H, Fukui Y** (2005) *Effect of the Well of the Well (WOW) System on In vitro Culture for Porcine Embryos after Intracytoplasmic Sperm Injection*. J. Reprod. Dev., 51, 533-537.
- 43. Taneja M, Yang XJ** (1998) *Promises and Problems of In vitroProduction of Embryos by TVOR-IVF Scheme in Cows and Heifers*. IETS Newsletter, 16:4, 14-19.
- 44. Tekeli T** (1983) *Tavşan Ovumlarının In vitro Fertilizasyonu Üzerinde Çalışmalar* (Doktora Tezi), A. Ü. Veteriner Fakültesi, Ankara.
- 45. Thibier M** (2004) *Stabilization of Numbers of In vivo Collected Embryos in Cattle but Significant Increases of In vitro Bovine Produced Embryos in Some Parts of the World*. IETS Newsletter, 22:4, 12-19.
- 46. Thompson JG** (2006) *The Impact of Nutrition of the Cumulus Oocyte Complex and Embryo on Subsequent Development in Ruminants*. J. Reprod. Dev., 52, 169-175.
- 47. Ushijima H** (2005) *Application Study of Developmental Engineering for Livestock Production*. J. Reprod. Dev., 51, 15-22.