

Sığırlarda follikül büyüklüğünün oositlerin *in vitro* maturasyonu üzerine etkisi

Şükrü KÜPLÜLÜ, Mustafa ÜN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara

Özet: Sunulan çalışmanın amacı, *in vitro* maturasyonda kullanılacak sığır oositlerinin aspire edildikleri folliküllerin büyüklüklerinin, oositlerin maturasyon kapasitesi üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Oosit kaynağı olarak mezbahadan toplanan toplam 300 sığır ovaryumu kullanıldı. Ovaryum üzerindeki folliküller sayıldı ve büyüklüklerine göre (Grup I, 1-3 mm; Grup II, 3-6 mm ve Grup III, 6-10 mm) gruplandırıldı. Folliküllerin punksiyonu yapıldı ve aspire edilen oositler stereomikroskop altında morfolojik durumlarına göre incelenip sınıflandırıldı. Yalnızca etrafları dört veya daha fazla cumulus hücre katmanı ile çevrili ve kumlu bir ooplazma görüntüsü veren oositler maturasyon vasatlarına (TCM-199 + %10 ECS) aktarıldı. Maturasyon kültürü 39°C'de, %5 CO₂ gaz atmosferinde 24 saat süreyle yapıldı. Maturasyon sonunda oositler mikroskop altında incelendi ve birinci kutup hücrelerini atan mature oosit sayıları kaydedildi. Çalışma gruplarında (Grup I, II ve III) elde edilen maturasyon yüzdeleri sırasıyla: %61, %76 ve %74 olarak bulundu. Sonuç olarak, follikül büyüklüğünün, sığır oositlerinin *in vitro* maturasyon başarısını belirgin ölçüde etkilediği ve follikül büyüklüğü arttıkça maturasyon başarısının yükseldiği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Follikül büyüklüğü, *in vitro* maturasyon, mezbaha, oosit, sığır

The effects of follicle diameter on the *in vitro* maturation of bovine oocytes

Summary: The aim of this study was to investigate the effects of the follicle diameter on the maturation capacity of the bovine oocytes *in vitro*. A total of 300 ovaries collected from the slaughterhouse were used for oocyte aspiration. Follicles were counted and grouped according to the diameter: Group I (1-3 mm), Group II (3-6 mm) and Group III (6-10 mm). Follicles were punctured and aspirated oocytes were examined under stereomicroscope for their morphological status and selection. Only the oocytes surrounded with four or more cumulus cell layers and sandy ooplasm were transferred to the maturation medium (TCM-199 + 10% ECS). Culture was conducted at 39°C, with 5% CO₂ gas atmosphere for 24 h. In the end of the maturation period oocytes were examined under microscope and maturation rates were recorded as the vision of the first polar body. Maturation rates found in the study groups (Group I, II and III) were 61%, 76% and 74%, respectively. As a result, it was evident that the follicle diameter highly influenced the maturation rates of the bovine oocytes, since the follicle diameter increased, maturation rate was advanced.

Key words: Bovine, follicle diameter, *in vitro* maturation, oocyte, slaughterhouse

Giriş

In vitro embriyo üretimi çalışmalarında, önceleri flushing yöntemi ile toplanan *in vivo* mature olmuş oositler kullanılırken (1), bu yöntem ile elde edilen oosit sayısının sınırlı kalması nedeniyle daha büyük bir kaynak olan immature oositlerden faydalanılma fikri ortaya atılmıştır (9). Immature oositler ultrasonografi rehberliğinde transvaginal ve laparotomi-endoskopi yöntemi ile canlı hayvanların ovaryumlarındaki yüzeysel folliküllerden aspire edilebilirken (10), anılan her iki teknikte de pahalı ekipmanların kullanılması, deneyim gerektirmesi ve sınırlı bir kaynak olması nedeniyle son yıllarda mezbahada kesilen sığırların ovaryumları oosit kaynağı olarak kullanılmaya başlanmıştır (9,15,20).

Immature oositler fertilizasyon yeteneği olmayan, çekirdeğinde diploid sayıda (2n) kromozom taşıyan oositler olup, fertilize olabilmeleri için bir maturasyon periyodu geçirmeleri gerekmektedir. Oositlerin maturasyonu, kromozom sayılarını yarıya indirecek (n=60) iki mayoz bölünme (çekirdek maturasyonu) ve bölünme son-

rası dönemde ihtiyacı olan enerjinin üretimi için organellere reorganizasyonunu (sitoplazma maturasyonu) içermektedir (15,18).

Herhangi bir zamanda ovaryumdaki preantral ve antral folliküllerden aspire edilen bir oosit birinci mayoz bölünmenin profaz I aşamasında LH dalgasını beklemektedir (6). Lüteinleştirici hormon dalgasından 4-8 saat sonra germinal vezikül yıkımlanır ve nükleus membranı kaybolurken kromozom dekonenzasyonu şekillenir (6,18,20). Oosit sırasıyla metafaz-I, anafaz-I ve telofaz-I aşamalarını geçirerek, birinci kutup hücrelerini atarak oosit-II adını alır (6,18). Bu aşamada ovulasyonla atılan oosit, bir spermatozoidin zona pellucida'ya tutunması ile ikinci kutup hücrelerini atar ve ovum adını alarak çekirdek maturasyonunu tamamlar (18,21).

Sitoplazma maturasyonu sırasında önce granülsüz endoplazmik retikulum granüllü hale geçer, daha sonra ribozomlar sayıca artar ve ooplazmanın periferine doğru hareket ederek kümeler oluştururlar (6). Bu süreçte ooplazma içerisindeki mRNA ve tRNA aktiviteleri artar (15).

Sitoplazma maturasyonu LH dalgasını izleyen 1-2. saatte başlar ve oositin fekondasyonundan sonra da devam eder (21).

Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonu, *in vivo* maturasyonun daha hızlı seyreden bir taklitidir (9). Thompson (19), oositlerin aspire edildikleri folliküllerin büyüklüklerinin artmasının maturasyon başarısını olumlu etkilediğini bildirmiş, Gordon (6) ise, bu durumu follikül büyümesine paralel olarak oositin de büyümesine bağlamıştır. Sirard ve Blondin (16), 2 mm'den küçük oositlerin mitoz karakteri kazanmadığını, 6 mm'den büyük folliküllerde ise atrezi dalgası görüldüğünü bildirmiş ve 2 mm'den küçük, 6 mm'den büyük folliküllerden elde edilen oositlerin maturasyon başarısının düşük olduğunu vurgulamıştır.

Bazı araştırmacılar (15,16,19,21) cumulus-oosit komplekslerinin morfolojisinin *in vitro* maturasyon üzerine çok etkili olduğunu bildirmiş ve bu durumun cumulus hücrelerinin oositin besin köprüsü olmasına bağlamışlardır. Younis ve ark. (23) oositleri etraflarındaki cumulus hücre katmanı sayısına göre sınıflandırmışlar ve etrafları 4 ve daha fazla cumulus hücre katmanı ile çevrili oositlerin maturasyon yeteneklerinin çok iyi olduğunu vurgulamışlardır.

Greve ve ark. (9) oosit maturasyonunda kullanılan vasatların başarıyı etkilediğini ve bu alanda sıklıkla tissue culture medium-199 (TCM-199), Menezo's B2, Tyrode, Ham's F10 ve F12, Bristers' ve minimum esansiyel medium (MEM) vasatlarının kullanıldığını bildirmektedir. Bu vasatlara maturasyon oranını arttırmak amacıyla canlı kökenli (serumlar, hormonlar, proteinler ve peptidler) ve sentetik (inhibin, aktivin, oksitosin, EGF) vasat katkıları eklenmektedir (19).

Sunulan çalışmanın amacı, farklı boyutlardaki folliküllerden elde edilen sığır oositlerinin maturasyon başarılarının incelenmesi ve follikül büyüklüğü ile maturasyon başarısı arasındaki ilişkinin ortaya konmasıdır.

Materyal ve Metot

Ovaryum toplanması ve transferi

Çalışmada, mezbahada kesilen değişik yaş, ırk ve fizyolojik statüdeki toplam 300 sığır ovariyumu kullanıldı. Ovaryumlar, kesimden hemen sonra karkastan ayrılarak, içerisine penisilin 100 IU/ml, streptomisin 50 mg/ml ve Amphotericin-B 50 mg/ml katılmış, yaklaşık 30-37°C sıcaklıktaki serum fizyolojik içinde laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvarda iki kez taze vasatla yıkanan ovariyumlar %70'lik etil alkolden geçirilerek kurumaya bırakıldı.

Oosit aspirasyonu ve seleksiyonu

Ovaryumdaki periferik folliküller bir kompas yardımıyla ölçülerek, çaplarına göre üç gruba ayrıldı (Grup I: 1-3 mm, Grup II: 3-6 mm ve Grup III: 6-10 mm). Her

grupta yer alan folliküller sayıldı ve bu folliküllere Fry ve ark. (5)'nin belirttiği yöntemle göre (ucunda 18G iğne bulunan steril enjektörlerle) punksiyon yapıldı. Toplanan folliküller sıvı ve cumulus-oosit kompleksleri 13 ml'lik steril konik santrifüj tüplerine aktararak, iki kez 500 devirde 10 dakika santrifügasyon yapıldı (oosit yıkama). Yıkama işlemi sonrası tüpün üstünde kalan folliküller sıvı atıldı ve dipteki çöktüntü, 4 ml steril serum fizyolojik ile sulandırılarak 6 mm'lik petri kutularına aktarıldı ve stereomikroskop altında incelemeye alındı. Oosit seleksiyonu Fry ve ark. (5)'nin belirttiği yöntemle yapılarak, yalnızca etrafları 4 ve daha fazla cumulus hücre katmanı ile sıkıca çevrili ve kumlu bir ooplazma görüntüsü veren oositler maturasyon işlemi için ayrıldı.

Oosit maturasyonu

Maturasyon vasatı olarak tissue culture medium (TCM-199) kullanıldı. Maturasyonun desteklenmesi amacıyla içerisine %10 (v/v) oranında ısıyla inaktive edilmiş (56°C'de 30 dakika) östrustaki sığır serumu (ECS) katıldı. Maturasyon için seçilen oositler 15-20'şerli gruplar halinde, içerisinden 1 ml vasat (TCM-199 + %10 ECS) bulunan 40 mm'lik petri kutularına aktararak, vasatların üzerleri steril parafin ile kapatıldı ve etüve yerleştirildi. Kültür, 39°C'de, %5 CO₂ gaz atmosferinde 24 saatte gerçekleştirildi.

Maturasyonun saptanması

Oositi çevreleyen cumulus hücrelerinin şişmesi ve gevşemesinin yanısıra birinci kutup hücrelerinin perivitellin boşlukta görülmesi maturasyon kriteri olarak kullanıldı.

İstatistiksel değerlendirme

Çalışmanın sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi Chikare (q2) metoduna göre yapıldı.

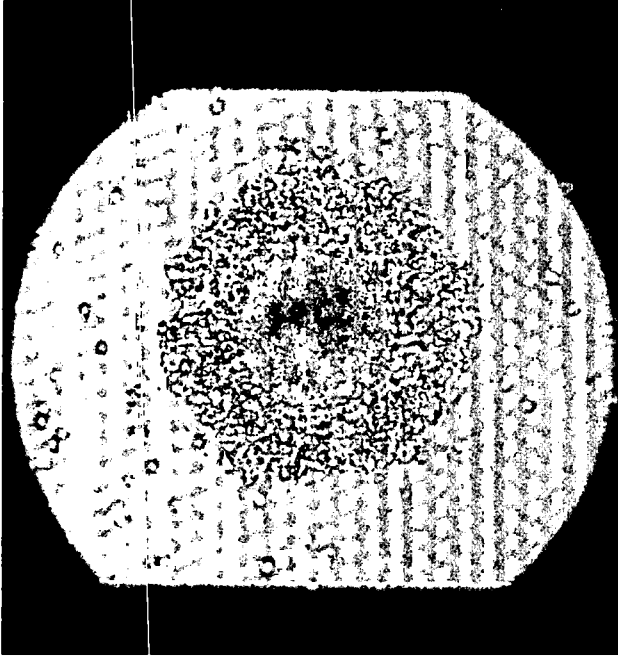
Bulgular

Çalışmada oosit kaynağı olarak kullanılan 300 ovariyumda gruplara göre aspirasyon işlemi uygulanan follikül sayıları, bu folliküllerden elde edilen ortalama oosit sayıları, oositlerin morfolojik dağılımları ve maturasyon yüzdeleri Tablo 1'de topluca sunulmuştur.

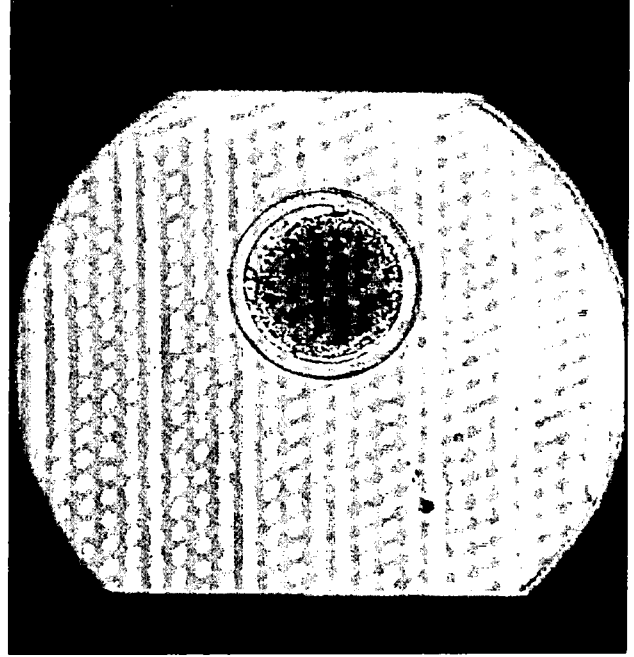
Tablonun incelenmesinden de anlaşılacağı gibi 1-3 mm'lik follikül sayıları (Grup I) diğer gruplardan (Grup II ve III) yüksek ve istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.01$).

Grup I ve II'deki maturasyon oranları birbirine benzer ($p > 0.05$) olmakla beraber, Grup III'den belirgin bir şekilde yüksek bulundu ($p < 0.05$).

Maturasyon kültürü sonrası Grup I'de %17, Grup II'de %7 ve Grup III'de %9'luk bir oosit lizisi izlendi. Lizise ek olarak Grup I'de 11, Grup II'de 9 ve Grup III'de 5 oositte cumulus ekspansiyonu izlenmezken kutup cisimciğinin atıldığı tespit edildi.



Şekil 1. Immature oosit.
Figure 1. Immature oocyte.



Şekil 2. Mature oosit.
Figure 2. Mature oocyte.

Tablo 1. Gruplara göre aspirasyon yöntemi ile elde edilen oositlerin morfolojik dağılımları ve maturasyon oranları.
Table 1. The morphological disperst and maturation rates of oocytes in study groups collected by aspiration.

	Grup I (1-3 mm)				Grup II (3-6 mm)				Grup III (6-20 mm)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Aspirasyon işlemi uygulanan follikül sayısı (ort)	1860 ^a (6.2)				1188 ^b (3.9)				540 ^b (1.84)			
Aspire edilen oosit sayısı (ort)	1798 ^c (5.9)				1188 ^d (3.9)				527 ^a (1.7)			
Aspire edilen oositlerin morfolojik dağılımları (%)	619 (34)	516 (28)	411 (22)	252 (14)	624 (52)	322 (27)	161 (13)	81 (7)	308 (57)	149 (29)	46 (9)	24 (5)
Mature oosit sayısı	377				474				228			
Maturasyon yüzdesi	%61 ^f				%76 ^c				%74 ^c			

^{a,b,c,d} Aynı satırda farklı harflerle işaretlenmiş veriler birbirinden belirgin oranda farklıdır ($p < 0.01$).

^{e,f} Aynı satırda farklı harflerle işaretlenmiş veriler birbirinden belirgin oranda farklıdır ($p < 0.05$).

I,II,III ve IV: Fry ve ark. (5)'na göre sınıflandırma

Tartışma ve Sonuç

Hazeleger ve ark. (11), 1-3 mm'lik folliküllerden aspire ettikleri oositlerin TCM-199 (+%10 ECS) vasatında maturasyon başarılarını inceledikleri çalışmalarında oositlerin %63'ünün metafaz II'ye ulaştığını, Greve ve Madison (8) ise TCM-199 (+%20 FCS + LH + E) vasatını kullandıkları çalışmalarında maturasyon oranını %79 olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada mezbahadan toplanan ovaryumlar üzerindeki 1-3 mm'lik folliküllerin aspirasyonu ile aspire edilen oositlerin TCM-199 + %10 ECS vasatında maturasyonları sonucu oositlerin %61'inin metafaz II'ye ulaştıkları tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç Leibfried-Rutledge ve ark. (13)'nin belirttiği sonuca uyarken, Greve ve Madison (8)'in sonuçlarından düşük bulunmuştur ve bu düşüklüğün anılan araştırmacıla-

rın maturasyon vasatlarına ekledikleri hormonlardan (FCS, LH ve E) kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mezbahadan topladıkları ovaryumlar üzerindeki 2-7 mm'lik folliküllerden aspire ettikleri oositlerin TCM-199 içerisinde maturasyona tabi tutulduğu çalışmalarda maturasyon başarılarını: Bols ve ark. (2) (TCM-199) %80, Carolan ve ark. (3) (TCM-199 + ECS) %76, Farin ve ark. (4) (TCM-199+ LH + FSH + E2) %76-93, Jewgnow ve ark. (12) (TCM-199 + BSA) %80, Otoi ve ark. (14) (TCM-199) %76, Sosnowski ve ark. (17) (TCM-199 + FCS + BSA) ise %74 olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada, 3-6 mm büyüklüğündeki folliküllerden elde edilen oositlerin maturasyon başarıları %76 olarak bulunmuştur. Bu sonuç yukarıda bildirilen araştırmacıların sonuçlarına benzerlik göstermektedir.

Leibfried-Rutledge ve ark. (13) yaptıkları çalışmada 6-20 mm çapındaki folliküllerden aspire ettikleri oositlerin TCM-199 içerisindeki maturasyon başarılarını %86 olarak bildirmiştir. Greve ve Madison (8) ise 5-8 mm'lik folliküllerden köken alan oositlerin yine TCM-199 içindeki maturasyon oranını %76 olarak bildirmiştir. Sunulan çalışmada 6-10 mm'lik folliküllerden aspire edilen oositlerin %71 oranında mature oldukları bulunmuştur. Bu sonuç, yukarıda bildirilen araştırmacıların sonuçlarına uymaktadır.

Xu ve ark. (21) küçük preantral folliküller (1-3 mm) içerisindeki oositlerde protein sentez yeteneğinin iyi olduğunu ancak siklik-AMP zincirinin henüz bölünmeyi destekleyecek RNA duyarlılığına sahip olmadığını ve bu nedenle bu folliküllerden alınan oositlerin mitoz yeteneğinin yok edecek kadar az olduğunu bildirmişlerdir. Gordon (6) ise 1-3 mm arasındaki folliküllerden alınan oositlerin büyüklüklerini 50-80 µm olarak bildirmekte ve düşük mitoz yeteneğini buna bağlamaktadır. Thibault ve ark. (18) oositi saran cumulus hücrelerinin diffüzyon yeteneklerinin sahnın östrojen ve oosit büyümesiyle ilgili olduğunu vurgularken, Gordon (6) corona radiata'yı saran granuloza hücrelerinin başkalaşım ve gelişimi için oositin kritik bir büyüklüğe ulaşması gerekliliğini bildirmiştir. Gordon ve Lu (7) ile Yang ve ark. (22) 2 mm'den küçük folliküllerde zona pellucida üzerinde LH reseptörlerinin yeterli sayı ve aktivasyonda olmadığını bildirirken, Gordon (6) buna ek olarak cumulus hücrelerinin LH'ya duyarlılığının yetersiz olduğunu vurgulamıştır. Gordon (6) bu durumu, 2-7 mm arasındaki follikül içerisindeki oositlerin normal büyüklüklerinin %80'ine ulaşmasına, Xu ve ark. (21) ise bu dönemdeki oositlerin hormon ve diğer sellüler uyarımlara maksimum duyarlılık göstermelerine bağlamaktadır. Yine Gordon (6) 2-7 mm'lik folliküllerdeki ATP sentezinin diğer tüm dönemlerden yüksek olduğunu bildirmiş ve dominant follikül farklılaşmasının bu döneme rastladığını vurgulamıştır. Gordon (6) folliküller 7 mm iken atrezi dalgasının başladığını ve dominant follikül dışındaki tüm folliküllerde regresyonun başladığını bildirmiştir. Atrezi başlayan folliküllerde kültür süreci sonunda maturasyona benzeyen pseudomaturasyon şekillenmekte ve bu nedenle maturasyon başarıları yüksek olmaktadır (18). Sunulan çalışmada, gruplarda elde edilen maturasyon oranları karşılaştırıldığında, en düşük maturasyon başarıları Grup I'de (1-3 mm) elde edilirken, diğer iki grupta (Grup II ve III) ulaşılan maturasyon sonuçları birbirine benzer bulunmuştur. Bu durum yukarıda açıklanan araştırmacı düşüncelerine uymaktadır. Ancak, *in vitro* embriyo üretimi tekniğinde maturasyon önemli bir aşama olmakla birlikte, gerçek anlamda maturasyonun ortaya konması fertilizasyon başarıları ve erkek pronukleusu geliştirebilme yeteneği ile ilişkilidir. Bu nedenle, anılan büyüklüklerdeki folliküllerden elde edilen oositlerin maturasyonları-

nın incelenmesinde, birinci kutup hücresinin atılması ve cumulus ekspansiyonu gibi morfolojik kriterler tek başlarına yeterli görünmese de, periferik folliküllerden elde edilen oositlerin embriyo üretimi çalışmaları için iyi bir kaynak oluşturduğu kanaatine varıldı.

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin ışığında, maturasyona alınacak oositlerin aspire edildikleri folliküllerin büyüklüğü ile maturasyon başarıları arasında pozitif bir korrelasyon olduğu ve belirli bir büyüklüğe ulaşmayan folliküllerden aspire edilen oositlerin *in vitro* fertilizasyonda kullanımlarının sınırlı kalacağı sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. **Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr T** (1992): *Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media*. Theriogenology, **37**, 127-147.
2. **Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenheede JMM, Kruif A** (1997): *Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes*. Theriogenology, **45**, 1001-1013.
3. **Carolan C, Lonergan P, Monget P, Monniaux D, Mermillod P** (1995): *Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes*. Theriogenology, **43**, 182-192.
4. **Farin CE, Hasler JF, Martus NS, Stokes JE** (1997): *A comparison of Menezos B2 and Tissue Culture Medium-199 for in vitro production of bovine blastocysts*. Theriogenology, **48**, 699-709.
5. **Fry RC, Niall EM, Simpson TL, Squires TJ, Reynolds J** (1997): *The collection of oocytes from bovine ovaries*. Theriogenology, **47**, 977-987.
6. **Gordon I** (1994): *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cabi Production, Philadelphia.
7. **Gordon I, Lu KH** (1990): *Production of embryos in vitro and its impact on livestock production*. Theriogenology, **33**, 77-87.
8. **Greve T, Madison V** (1991): *In vitro fertilization in cattle: a review*. Reprod Nutr Develop, **31**, 147-157.
9. **Greve T, Madison V, Avery B, Callesen H, Hytell P** (1993): *In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations*. Anim Reprod Sci, **33**, 51-69.
10. **Hashimoto S, Takakura R, Kishi M, Sudo T, Minami K, Yamada M** (1999): *Ultrasound-guided follicle aspiration: The collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live ovaries*. Theriogenology, **51**, 757-765.
11. **Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS** (1995): *Relation of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro*. Theriogenology, **43**, 509-522.
12. **Jewgnow K, Heerdegen B, Müller K** (1999): *In vitro development of individually matured bovine oocytes in relation to follicular wall atresia*. Theriogenology, **51**, 745-756.

13. Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Parrish JJ, First NL (1989): *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, **31**, 61-74.
14. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T (1997). *Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence*. *Theriogenology*, **48**, 769-774.
15. Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez-Martinez H (1993): *Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions*. *Anim Reprod Sci*, **31**, 49-60.
16. Sirard MA, Blondin P (1996): *Oocyte maturation and IVF in cattle*. *Anim Reprod Sci*, **42**, 417-426.
17. Sosnowski J, Switonski M, Lechniak D, Molinski K (1996): *Cytogenetic evaluation of in vitro matured bovine oocytes collected from ovaries of individual donors*. *Theriogenology*, **45**, 865-872.
18. Thibault C, Szöllösi D, Gerard M (1987): *Mammalian oocyte maturation*. *Reprod Nutr Develop*, **27**, 865-896.
19. Thompson JG (1997): *Comparison between in in-vivo derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants*. *Reprod Fertl Dev*, **9**, 341-354.
20. Trounson A (1992): *The production of ruminant embryos in vitro*. *Anim Reprod Sci*, **28**, 125-137.
21. Xu KP, Greve T, Smith S, Hytell P (1986): *Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro*. *Acta Vet Scand*, **27**, 505-519.
22. Yang X, Jiang S, Foote RH (1993): *Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures*. *Mol Reprod Dev*, **34**, 94-100.
23. Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA (1989): *Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro*. *Gamete Res*, **23**, 189-201.

Geliş tarihi: 27.2.2001 / Kabul tarihi : 14.3.2001

Yazışma adresi:

Prof. Dr. Şükrü Küplülü
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı
06110 Dışkapı, Ankara