

16. **Özak A** (2000): *Köpeklerin Antebrachium Kırıklarında Radius'un Osteosentezinde Dinamik Kompresyon Plağı (DCP) ve İntrameduller Çivileme Yöntemi ile Sağlanan Sonuçların Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi*. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
17. **Özdemir V** (1995): *Veteriner Ortopedik Şirurjide İntrameduller Pinler*. Seminer, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Seminer.
18. **Piermattei DL** (1993): *An Atlas of Surgical Approaches to the Bones and Joints of the Dog and Cat*. 124-219. 3<sup>rd</sup> ed. WB Saunders Company, Philadelphia.
19. **Roe S** (2003): *Internal Fracture Fixation*. 1798-1811. In: DH Slatter (Ed), *Textbook of Small Animal Surgery*. 3<sup>rd</sup> ed, WB Saunders Company, Philadelphia.
20. **Roush JK, Mclaughlin RM** (1999): *Using interlocking nail fixation to repair fracture in small animals*. *Vet Med*, **94**, 46-52.
21. **Ruddy RG** (1975): *Principles of intramedullary pinning*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **5**, 209-228.
22. **Schrader SC** (1991): *Complication associated with the use of steinmann intramedullary pins and cerclage wires for fixation of long-bone fracture*. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract*, **21**, 687-703.
23. **Willson JW** (1991): *Vascular supply to normal bone and healing fractures*. *Semin Ved Med Surg (Small Anim)*, **6**, 26-38.
24. **Yücel R, Finci A, Büyükönder H, Arıkan N** (1982): *Kedi ve köpeklerdeki femur kırıkları ve tedavileri üzerinde araştırmalar*. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, **8**, 15-38.

Geliş tarihi : 30.11.2004 / Kabul tarihi: 13.12.2004

**Yazışma adresi:**

Doç. Dr. Hasan Bilgili  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Ortopedi ve Travmatoloji Bilim Dalı,  
06110 Dışkapı, Ankara

## Mezbahadan toplanan ovaryumlardan elde edilen sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonu ve fertilizasyonu\*

Mustafa ÜN<sup>1</sup>, Şükrü KÜPLÜLÜ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara

**Özet:** Bu çalışmada, mezbahadan toplanan ovaryumlardan elde edilen sığır oositlerinin maturasyon ve fertilizasyon oranlarının follikül çapı ile ilişkilendirilerek ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışma materyali olarak Ankara ili Çubuk ilçe mezbahasında kesilen hayvanlardan toplanan 575 ovaryum kullanıldı. Ovaryumların üzerlerindeki yüzeysel folliküller çaplarına göre (2-7 mm-Grup I ve 7-10 mm-Grup II) sayıldı. Tüm folliküllerin 18 G iğne ile punksiyonları yapılarak oositler aspire edildi. Aspire edilen kumulus-oosit kompleksleri morfolojilerine göre sınıflandırıldı. Yanlızca I. ve II. kalite oositler *in vitro* maturasyon vasatına (TCM-199+%10 (v/v) FCS+%0.6 BSA) aktarılarak, 39°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub> atmosferinde 22-24 saat inkübe edildi. İnkubasyon sonrası mature oositler fertilizasyon vasatına (TALP+10 µg/ml Heparin) aktarıldı. Fertilizasyon, 39°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub> atmosferinde 18-19 saatte gerçekleştirildi. Grup I'de aspirasyondan sonra I ve II. kalite oldukları belirlenen toplam 1911 ve Grup II'de 1108 kumulus-oosit kompleksinin maturasyon kültürü sonrası Grup I'de 1327 ve Grup II'de ise 823'ünde maturasyonun şekillendiği saptandı. Grup I ve II'de elde edilen maturasyon yüzdeleri ise sırasıyla %69.44 ve %74.2 olarak belirlendi (p>0.05). Grup I'de 1327 oositten 576 (%43.4)'sında ve Grup II'de 823 oositten 419 (%51)'unda fertilizasyon şekillendi. Sonuç olarak, mezbahadan toplanan sığır ovaryumları *in vitro* embriyo üretiminde iyi bir kaynak olduğu, ancak toplanan ovaryumların yüzeyindeki folliküllerden aspire edilen oositlerin maturasyon ve fertilizasyon kapasiteleri oldukça değişkenlik gösterdiği ve *in vitro* çalışmalarda kullanılabilir oositlerin elde edildikleri folliküllerin çapları ile oositlerin maturasyon ve fertilizasyon başarıları arasında kuvvetli bir ilişki olduğu, follikül ölçüsü arttıkça fertilizasyon oranının yükseldiği sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Fertilizasyon, *in vitro* maturasyon, oosit, sığır.

### ***In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes aspirated from the slaughtered ovaries**

**Summary:** The aim of this study was to determine the maturation and fertilization capacities of bovine oocytes aspirated from slaughtered ovaries in relation with the follicle diameter. A number of 575 ovaries collected from the slaughtered cows at the Municipal slaughterhouse of Çubuk, Ankara were used as the material. Peripheral follicles were counted according to their diameters (2-7 mm-Group I and 7-10 mm-Group II). Whole follicles were punctured with an 18 G needle hold on a 5 ml syringe and aspirated kumulus-oocyte complexes were classified in regard to their morphological appearance only grade I and II oocytes were then placed in maturation medium (TCM-199+%10 (v/v) FCS+10.6 BSA) and incubated under an atmosphere of %5 CO<sub>2</sub> at 39 C° for 22-24 hr. At the end of the maturation period the matured oocytes were transferred to the fertilization media (TALP+10 µg/ml Heparine) for *in vitro* fertilization. Incubation was held under an atmosphere of %5 CO<sub>2</sub> at 39 C° for 18-19 hr. After the maturation period, 1327 of 1911 oocytes in Group I and 823 of 1108 oocytes in Group II were found as mature. The maturation rates observed in the study groups were 69.44% and 74.2% respectively (p>0.05). In Group I, 576 of 1327 (43.4%) and 419 of 823 oocytes in Group II (51%) were fertilized. As conclusion, it was evident that the ovaries collected from the slaughterhouse are sufficient potentials for *in vitro* embryo production, although a great variation between the maturation and fertilization capacities of oocytes aspirated from the peripheral follicles could be observed. It was also obvious that there is a significant relation between the follicle diameter and maturation and fertilization capacities of oocytes since the fertilization rates increases as the follicle diameter rises.

Key words: Bovine, fertilization, *in vitro* maturation, oocyte.

### **Giriş**

Maturasyon, oogenezis ve follikülogenezis olgusunun bir evresidir. Bu evre oositin fertilize olabilme ve fertilizasyon sonrası yaşama gücü olan bir bireye dönüşebilme yeteneğini kazanması şeklinde tanımlanmaktadır. Bir başka deyişle maturasyon, oositlerin fertilizasyon

öncesi diploid olan (2n) kromozom sayılarını haploide (n) indirecek bir mayoz bölünme sürecini geçirmeleri ve bu bölünmeyle paralel seyreden bir organel reorganizasyonu ile fertilizasyon yeteneğini kazanmaları olarak açıklanmaktadır. Her ne kadar oosit maturasyonu hayvanın pubertaya girmesiyle başlasa da primordiyal germ

\* Aynı isimli doktora tez çalışmasından özetlenmiştir. Çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 00-50.04 nolu proje ile desteklenmiştir.

hücrelerinden tam mature oosite kadar meydana gelen tüm gelişim ve başkalaşım olayları indirekt olarak maturasyonu etkilemektedir (9,23).

Maturasyon, oosit çekirdeğinde ve sitoplazmasında meydana gelen ve birbirine eş zamanlı seyreden değişiklikleri kapsamaktadır (2). Nükleer maturasyonda çekirdeğin yıkılması (Germinal Vesicle Break-Down-GVBD), kromozom dekonduksiyonu, iğ oluşumu ve kutup hücrelerinin atılması olayları görülür. Nükleer maturasyonun başlaması için LH hormonunun tetikleyici, devamı içinse steroidlerin mayozisi destekleyici etkisine ihtiyaç olması nedeniyle bu dönem hormona bağlı bir dönemdir. Nükleer maturasyon zamana bağlı olarak şekillenmekte, her türe özgü bir sürede (sığırlarda 24-48 saat, insanda 16-28 saat gibi) tamamlanmakta, durması veya duraksamasının ise oositin dejenerasyonuna yol açtığı bildirilmektedir. Folliküler hücrelerde steroidogenezis aktivitesinin şekillenmesi ve gonadotropin reseptörlerinin yeterince gelişmesi maturasyonun başlaması açısından önem taşısa da folliküler hücrelerin varlığının, folliküler hücre-oosit ilişkisinin ve folliküler hücre büyümesinin nükleer maturasyonun devamı üzerine etkisinin az olduğu ileri sürülmektedir (2). Sitoplazma maturasyonunda, sitoplazma içerisinde yeralan nükleus, nukleolus, mitokondria, ribozom, golgi kompleksi gibi organellerde yer değiştirme, farklı fonksiyon kazanma, aktivasyon ve/veya sayıca artış ve farklılaşma gibi olayların gözlemlendiği bildirilmekte ve çekirdek maturasyonu ile eş zamanlı şekillenen ve döllenebilme yeteneğinin kazanılmasında çekirdek maturasyonunu tamamlayıcı olduğu belirtilmektedir (19).

Oositlerin aspire edildikleri folliküllerin büyüklükleri, kumulus hücrelerinin varlığı, kumulus-oosit komplekslerinin morfolojisi, oosit büyüklüğü, ovaryum kaynağı (canlı hayvan ya da mezbahe materyali), ovaryumların alındıkları hayvanların yaş, vücut kondüsyonları, östrus aşaması ve gebelik durumu gibi kontrol edilemeyen faktörler sığırlarda oositlerin *in vitro* maturasyon başarısını indirekt olarak etkilemektedir (10).

Bu çalışmanın amacı, *in vitro* embriyo üretimi teknolojisinin başlangıç ve en kritik basamakları olan *in vitro* oosit maturasyonu, *in vitro* spermatozoon kapasitasyonu ve *in vitro* fertilizasyonun gerçekleştirilmesi ve karşılaşılabilecek engellerin aşılmasıdır.

### Materyal ve Metot

Çalışmada oosit kaynağı olarak Ankara İl'i mezbahalarında kesilen hayvanlardan elde edilen 575 ovaryum kullanıldı ve zaman içerisinde araştırmacının deneyiminin artması ile oluşabilecek değişimlerin belirlenmesi amacıyla denemeler 23 kez tekrarlandı. Ovaryumlar, hayvanların kesiminden hemen sonra alınarak, içinde taşıma vasatı bulunan termoslara toplandı.

### Oosit aspirasyonu ve oositlerin seleksiyonu

Ovaryum üzerindeki periferal folliküller kompas yardımıyla ölçülerek büyüklüklerine göre 2-7 mm'lik ve 7-10 mm'lik iki gruba ayrılarak sayıldı ve kaydedildi. Periferal folliküllerin punksiyonları, ucuna 18 Gauge'luk steril iğne takılmış ve 0.25-0.5 ml maturasyon vasatı (TCM-199, M2520, Sigma Co. EU) çekilmiş 5 ml'lik steril plastik enjektörlerle gerçekleştirildi.

Kumulus oosit komplekslerinin morfolojik seleksiyonu Brackett ve Zuelke (1)'nin tarif ettiği yöntemle yapıldı. Çeperleri dört veya daha fazla kumulus hücre katmanı ile sıkıca çevrili, kumlu bir ooplazma görüntüsüne sahip oositler (kalite I ve II) ayrı bir petriye aktarıldı.

### *In vitro* oosit maturasyonu (IVM)

Maturasyon vasatı olarak Yang ve ark. (25) ve Farin ve ark. (3) bildirdiği şekilde, Doku Kültürü Vasatı-199 (TCM-199) (M2520, Sigma Co., EU) kullanıldı ve vasata protein katkısı olarak: %10 Föetal Buzağı Serum (Fetal Calf Serum-FCS, F6783 Cat. No., Sigma Co. EU) ve 6 mg/ml Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin-BSA, A1933, Sigma Co. EU) katıldı. Buna ek olarak vasata antibiotik (100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 0.25 µg/ml amfoterisin-B- A5955, Sigma Co., EU) eklendi.

Oositler 2 ml'lik vasata 10-20 adet oosit gelecek popülasyonda petrilere konuldu ve üzerileri bir damla parafin yağı damlatılarak kapatıldı. Maturasyon işlemi 39°C inkübatörde, %5 CO<sub>2</sub> atmosferinde, maksimum nemde, 24 saatte gerçekleştirildi.

### *In vitro* sperm kapasitasyonu

Kapasitasyon işlemi öncesi motil spermatozoaların seçilmesi amacıyla Gordon (6)'ün tarif ettiği şekilde yüzdürme deneyi (swim-up) uygulandı. Fertilizasyon vasatı olarak glukozsuz Tyrode'nin Albumin Laktat Piruvat vasatı kullanıldı (fert-TALP-T-2397-3 Cat. No., Sigma Co., EU). Fertilizasyon için 50 µl'lik vasata 10 oosit ve 1x 10<sup>4</sup> spermatozoon/ml (1-2 µl final sperma solüsyonu) konularak 39°C'de %5 CO<sub>2</sub> atmosferinde 20-22 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Fertilizasyonun gerçekleştiği, inkübasyonun başlangıcından 19-20 saat sonra erkek ve dişi pronukleusların görülmesiyle doğrulandı.

### İstatistiksel değerlendirme

Çalışma gruplarında follikül sayıları, toplanan oosit sayıları ve aspirasyon başarıları Student's T testi ile, elde edilen maturasyon ve fertilizasyon bulgularının istatistiksel değerlendirmesi ise ki-kare testiyle yapıldı.

### Bulgular

Çalışma materyali olarak kullanılan 575 ovaryumda 2-7 mm'lik yüzeysel folliküllerden (Grup I) 2941 (ovaryum başına ort. 5.11 ± 2.39) follikül sayıldı. Bu

folliküllerin aspirasyon işlemi ile 2745 kumulus-oosit kompleksi %93.3'lük bir başarıyla toplandı. Ovaryum başına oosit sayısı 2.6 ile 6.5 arasında değişirken ortalama olarak 4.77 ( $\pm 2.09$ ) oosit aspire edildi.

Grup I'de sayılan follikül ve aspire edilen oosit sayıları Grup II'ye göre yüksek bulundu. Bu farklılığın istatistikî açıdan da önemli olduğu belirlendi ( $p < 0.01$ ). Buna karşın aspirasyon başarıları arasında istatistikî bir fark saptanmadı.

#### Aspire edilen kumulus-oosit komplekslerinin seleksiyonu

Grup I'de (2-7 mm folliküller) yeralan folliküllerden aspire edilen 2745 kumulus-oosit kompleksinin stereomikroskopik değerlendirilmesinde 1030 adetinin I. kalite (%37.5), 881 adetinin II. kalite (%32.09), 538 adetinin III. kalite (%19.59) ve 296 adetinin IV. kalite (%10.78) olduğu belirlendi.

Grup II'deki (7-10 mm) folliküllerden aspire edilen 1377 kumulus-oosit kompleksinin 677 adetinin I. kalite (%49.16), 430 adetinin II. kalite (%31.2), 151 adetinin III. kalite (%10.96) ve 118 adetinin IV. kalite (%8.56) olduğu görüldü.

Çalışma sırasında ovaryum başına elde edilen ortalama iyi kalite oosit sayıları (I. ve II. kalite) Grup I'de  $3.51 \pm 0.59$  ve Grup II'de ise  $2.01 \pm 1.35$  olarak bulunmuş ve bu oosit ortalamalarının birbirinden istatistikî olarak farklı oldukları saptanmıştır ( $p < 0.01$ ).

#### In vitro oosit maturasyon bulguları

Grup I'de aspirasyondan sonra I ve II. kalite oldukları belirlenen toplam 1911 ve Grup II'de 1108 kumulus-oosit kompleksinin maturasyon kültürü sonrası, Grup I'de 1327 ve Grup II'de 823'ünde kumulus hücrelerinin şişmesi ve I. kutup hücresinin atılması gibi maturasyon kriterleri belirlenmiş ve bu oositlerin mature olduğu kabul edilmiştir. Grup I ve II'de elde edilen maturasyon yüzdeleri ise sırasıyla %69.44 ve %74.2 olarak belirlenirken, Grup I'deki oositlerin %8'inde ve Grup II'deki oositlerin %5.1'inde maturasyon bozuklukları izlendi. Çalışma gruplarında mature oosit sayıları ve maturasyon başarıları (%) Tablo 1.'de sunulmuştur.

Tablo 1. *In vitro* oosit maturasyonu sonrası gruplarda elde edilen maturasyon sonuçları

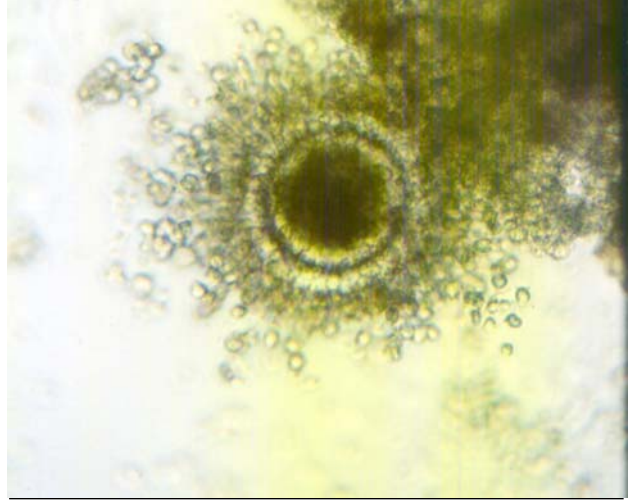
Table 1. Maturation rates in groups after the *in vitro* maturation process

Parametre	Grup I (2-7 mm)	Grup II (7-10 mm)
Maturasyona alınan oosit (n)	1911	1108
Mature oosit (n)	1327	823
Maturasyon başarıları	%69.44 <sup>a</sup>	%74.2 <sup>a</sup>
Maturasyon bozuklukları	$152 \pm 1.30$	$76 \pm 1.17$
Maturasyon bozuklukları(%)	%8	%5.1

Aynı satırda farklı harflerle işaretlenmiş sütunlar birbirinden istatistikî olarak farklıdır.

Çalışmada ulaşılan maturasyon başarıları incelendiğinde gruplar arasında istatistikî bir fark belirlenememiş ( $p > 0.05$ ), ancak grup içerisinde tekrarlar arasında maturasyon başarıları yönünden belirgin bir fark gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ).

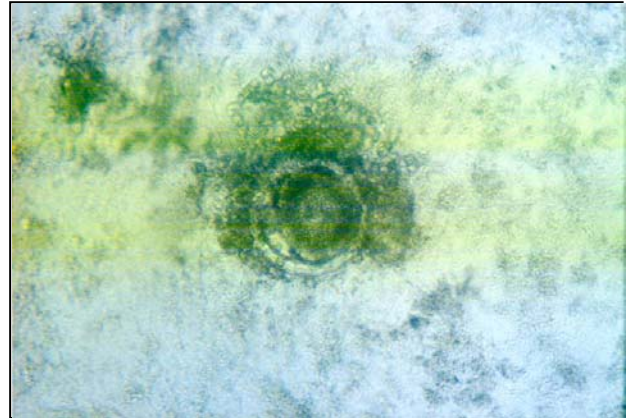
*In vitro* maturasyon kültüründen sonra kumulus-oosit komplekslerinin mikroskopik incelemesinde, mature oositlerin etraflarını çevreleyen kumulus hücrelerinde sitoplazma genişlemesi ve hücre duvarlarının silikleşmesi ile karakterize kumulus ekspansiyonu ve perivitellin boşlukta birinci kutup hücresi görüldü (Şekil 1).



Şekil 1. *In vitro* maturasyon sonrası tam mature olmuş oosit  
Figure 1. A matured oocyte after *in vitro* maturation

#### In vitro fertilizasyon bulguları

Grup I ve II'ye ait maturasyon kriterlerine uygun sırasıyla 1327 ve 823 kumulus-oosit kompleksi *in vitro* fertilizasyon işlemi için kullanıldı. Bu oositlerden Grup I'de 576 (%43.4)'sında ve Grup II'de 419 (%51)'unda, fertilizasyon kültürü sonrası mikroskopik incelemede, hem erkek hem de dişi pronukleus görülerek fertilize oldukları kabul edildi (Şekil 2).



Şekil 2. *In vitro* fertilizasyon kültürü sonrası fertilize olmuş oosit  
Figure 2. A fertilized oocyte after *in vitro* fertilization

Grup I ve II fertilizasyon başarıları yönünden karşılaştırıldığında Grup II'deki fertilizasyon başarısının belirgin ölçüde yüksek olduğu saptanmış ( $p<0.05$ ) (Tablo 2).

Tablo 2. *In vitro* fertilizasyon sonrası gruplarda elde edilen fertilizasyon sonuçları

Table 2. Fertilization rates in groups after the *in vitro* fertilization process

Parametre	Grup I (2-7 mm)	Grup II (7-10 mm)
Fertilizasyona alınan oosit (n)	1327	823 <sup>b</sup>
Fertilize oosit (n)	576	419
Fertilizasyon başarısı	%43.4 <sup>a</sup>	%51 <sup>b</sup>
Partenogenez (n) (%)	40(%3)	22(%2.7)
Polispermi (n) (%)	46 (%3.4)	39 (%4.7)
Fertilizasyon dejenerasyonu	11 (%0.8)	7 (0.85)

Aynı satırda farklı harflerle işaretlenmiş sütunlar birbirinden istatistiki olarak farklıdır (a,b,  $p<0.05$ )

### Tartışma

Loos ve ark. (14), aspire ettikleri kumulus-oozit komplekslerini etraflarındaki kumulus hücre yoğunluğuna göre dört gruba ayırdıkları çalışmada bu oositleri TCM-199 ve %10 FCS vasatında mature etmişler ve I. kalite oositlerde %80, II. kalite oositlerde %75 oranında maturasyon başarısı bildirmişlerdir.

Yang ve ark. (25) ise follikülleri 1-2, 2-6 mm ve 6-8 mm olarak sınıflandırmışlar ve bu folliküllerden aspire ettikleri kumulus-oozit komplekslerinin TCM-199 vasatındaki kültürü sonucunda sırasıyla %58, %75 ve %84'lük bir maturasyon başarısına ulaşmışlardır.

Xu ve ark. (24), 6 mm'den büyük folliküllerden aspire edilen oositlerin maturasyon başarılarının, 6 mm'den küçük folliküllerden alınanlara oranlara %25-40 daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Lee ve ark. (11) ise bu sonucun sitoplazmik maturasyonun büyük folliküllerde (5-10 mm) çok daha iyi şekillenmesine bağlamışlardır.

Lonergan ve ark. (13), değişik folliküllerden elde edilen oositlerin maturasyon başarılarını karşılaştırdıkları çalışmada maturasyon oranlarını %0 (0.1-0.5 mm), %16.12 (0.5-1 mm), %15.38 (1-1.5 mm), %57.14 (1.5-2 mm), %87.75 (2-3 mm), %88.13 (3-4 mm), %84.61 (4-5 mm) ve %87.5 (5-6 mm) olarak bildirmişlerdir.

Motlik ve Fulka (16), 0.5-1.6 mm, 1.8-3 mm ve 4-8 mm'lik folliküllerden aspire edilen oositlerde sırasıyla %0, %84 ve %79'luk maturasyon başarısı elde edildiğini bildirmişlerdir.

Vergos ve ark. (22), 2-5 mm'lik ve 8-10 mm'lik folliküllerden elde edilen kumulus-oozit komplekslerinin sırasıyla %80.6 sını ve %78.3'ünün mature olduğunu ve bu iki grup arasında maturasyon açısından bir fark olmadığını bildirmişlerdir.

Greve ve Madison (8), %10 oranında FCS kattıkları TCM-199 vasatında maturasyon oranını %80 olarak bildirirlerken, Younis ve ark. (26) aynı ortamda %59.2 maturasyon ve %24.8 fertilizasyon başarısı bildirmektedirler. Yang ve ark. (25) TCM-199+%7.5 FCS ile maturasyon başarısını %90-95 olarak bildirmişlerdir. MacCallum ve ark. (15) TCM-199 vasatına hiçbir katkı maddesi eklememişler ve 18. saatin sonunda maturasyon başarısını %39 ve dejenere oosit oranını %18 olarak bildirmişlerdir. Telfer (20), TCM-199+ECS/FCS ile maturasyon oranını %62.8 olarak bildirmiştir.

Leibfried-Rutledge ve ark. (12) yalnızca TCM-199 vasatında maturasyonun %88 olduğunu, TCM-199'a çeşitli hormonların (LH+FSH+E<sub>2</sub>) eklenmesiyle ile maturasyon oranının %90'a yükseldiğini vurgulamışlardır. Greve ve ark. (7) ise TCM-199 vasatına ek olarak ECS (%20) kullanmış ve maturasyon başarısını %83 olarak bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada 2-7 mm çapındaki folliküllerden (Grup I) elde edilen oositlerde maturasyon oranı %69.44 olarak belirlenirken, 7-10 mm çapındaki folliküllerden (Grup II) aspire edilen I. ve II. kalitedeki oositlerde maturasyon %74.2 olarak bulunmuş, Grup I ve II arasında maturasyon başarısı yönünden belirgin bir farkın görülmemesinin ise, farklı ölçülere sahip olsalar da her iki çaptaki follikülün de aynı ovaryumda olmaları ve dolayısı ile aynı hormonal etkileşimlere uğramalarına, hormon reseptörlerinin 2 mm'lik folliküllerde bile yeterince sentezlendiği ve kumulus hücre kalitesinin benzerliğine bağlı olduğu düşünülmektedir. Gruplar arasında maturasyon açısından bir fark bulunamamasına rağmen çalışma sırasında gerçekleştirilen tekrarlarla aynı grup içerisinde farklılıklar tespit edilmiş ve bu farklılıkların materyal olarak kullanılan ovaryumların alındıkları hayvanların bir örnek olmayıp, birbirinden çok farklı ırk ve vücut kondüsyonlarına sahip olmalarına bağlı olarak gerçekleştiği kanısına varılmıştır.

Sunulan çalışmada gruplarda elde edilen ortalama maturasyon başarıları de Loos ve ark. (14), Yang ve ark. (25), Motlik ve Fulka (16), Vergos ve ark. (22)'un sonuçlarına benzer olduğu; farklı maturasyon tekniklerinin kullanılması nedeniyle Lonergan ve ark. (13)'in sonuçlarından düşük olduğu düşünülmektedir. Maturasyon başarısının aynı maturasyon vasatlarını kullanan araştırmacılar- dan (8,25) düşük bulunmasının ovaryum kaynağı olan hayvanların reproduktif farklılıklarından kaynaklandığı; yüksek bulunmasının ise (20) vasata eklenen vasat katkılarının farklılığından dolayı olduğu kanısına varıldı.

Yang ve ark. (25), *in vitro* fertilizasyonda kullanılacak spermatozoaların kapasitasyonunda yararlanılacak heparin için önerilen pekçok doz olmasına rağmen esasta kullanılan iki dozun (10 ve 100 µg/ml) bulunduğunu

bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada bu iki dozu, fertilizasyon başarısı yönünden karşılaştırmışlar ve bu iki konsantrasyonda sırasıyla %50.5 ve % 60 fertilizasyon başarısı elde etmişlerdir. Trounson (21) ise 10 µg/ml heparin ile 4 saatlik bir inkubasyonun, 100 µg/ml dozundan %10-70 daha yüksek bir akrozom reaksiyonu başarısı sağladığını ve ortalama fertilizasyon yüzdelere sırasıyla %44 ve %51 olarak bildirmiştir. Fukui ve Ono (5), Brackett ve Zuelke (1) ve Fayrer-Hosken ve Stroud (4), *in vitro* fertilizasyon amacıyla Tyrode vasatını kullanmışlar ve swim-up testi ile motilitesini arttırdığı spermanın kapasitesini için 10 µg/ml heparinden yararlanmışlar; sırasıyla %52.4'lük ve %75'lik bir fertilizasyon oranına ulaşmışlardır. Fukui ve Ono (5) ise swim-up testi uygulamayıp heparin kullanmışlar ve oositlerin %62.2'sinin fertilize olduklarını saptamışlardır.

Gordon (6) swim-up tesitinin kapasitesinin etkinliği ve fertilizasyonun başarısı üzerine önemli bir etkisi olduğunu belirtirken, etkin bir swim-up testi ile fertilizasyon oranının %76'ya çıkarılabileceğini vurgulamıştır.

Sanbuissho ve Threlfall (17) yaptıkları çalışmada fertilizasyon vasatı olarak Tyrode yerine TCM-199 kullanmış ve 60 dakikalık bir kapasite inkubasyonu sonrası %70.4'lük bir fertilizasyon oranı elde etmişlerdir.

Sunulan çalışmada kapasite amacıyla 10 µg/ml heparin kullanılmış ve Grup I'de (2-7 mm) %43.4 ve Grup II'de %51'lik fertilizasyon başarısı elde edilmiştir. Gruplar arasındaki bu farkın gruplarda yeralan oositlerin *in vitro* maturasyon sırasında sitoplazmik maturasyonu yeterli bir biçimde gerçekleştirmelerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu kanı Schellander ve ark. (18) (2-8 mm/>8 mm, %41/%63) ve Gordon (6)'ün (1-5 mm/5-10 mm, %38/%65) çalışma sonuçlarına uymaktadır.

Çalışmada Grup I ve II arasında fark olmasının yanında, grup içinde tekrarlar arasında tespit edilen farkın yine ovaryum donörlerinin bir örnek olmaması, kullanılan spermanın aynı boğadan alınan sperma olmayıp bir örneklik göstermemesi, swim-up test tekniğinin ve fertilizasyon vasatına katılan sperma dozlarının kişisel becerinin gelişmesi ile standardize edilebilmesi olduğu kanısına varıldı.

### Kaynaklar

1. **Brackett BG, Zuelke KA** (1993): *Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos*. Theriogenology, **39**, 43-64.
2. **Cupps PT** (1991): *Reproduction in Domestic Animals*. Fourth edition, Academic Press Inc., Oxford, UK.
3. **Farin CE, Hasler JF, Martus NS, Stokes JE** (1997): *A comparison of Menezo's B2 and tissue culture medium-199 for in vitro production of bovine blastocysts*. Theriogenology, **48**, 699-709.
4. **Fayrer-Hosken RA, Stroud B** (1989): *Multiple embryo production in the cow after laparoscopic oocyte collection and oviductal transfer*. Theriogenology, **31**, 192-199.
5. **Fukui Y, Ono H** (1988): *In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilized bovine oocytes*. Vet Rec, **122**, 122-140.
6. **Gordon I** (1994): *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cab international Co., Wallingford, UK.
7. **Greve T, Avery B, Callesen H** (1993): *Viability of in vivo and in vitro produced bovine embryos*. Reprod Dom Anim, **28**, 164-169.
8. **Greve T, Madison V** (1991): *In vitro fertilization in cattle: A review*. Reprod Nutr Dev, **31**, 147-157.
9. **Küplülü Ş, Ün M** (2000): *Mezbahadan elde edilen sığır ovaryumlarında yüzeysel follikül potansiyelinin belirlenmesi ve oosit aspirasyonu*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **47**, 247-254.
10. **Küplülü Ş, Ün M** (2001): *Sığırlarda follikül büyüklüğünün oositlerinin vitro maturasyonu üzerine etkisi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **48**, 201-205.
11. **Lee ES, Fuji Y, Fukui Y** (1995): *A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3) cell bovine embryos after in vitro maturation and fertilization*. Theriogenology, **45**, 1151-1162.
12. **Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL** (1989): *In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes*. Theriogenology, **31**, 61-74.
13. **Loneragan P, Moneghan P, Rizoz D, Boland MP, Gordon I** (1994): *Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro*. Mol Reprod Dev, **37**, 48-53.
14. **Loos De F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruij Th AM** (1989): *Morphology of immature bovine oocytes*. Gam Res, **27**, 197-204.
15. **MacCallum C, Salamone D, Palasz AT** (1997): *Effect of maturation medium supplements on bovine oocyte fertilization and embryo development*. Theriogenology, **47**, 193-196.
16. **Motlik J, Fulka J** (1986): *Factors affecting meiotic competence in pig oocytes*. Theriogenology, **25**, 87-96.
17. **Sanbuissho A, Threlfall WR** (1989): *The effects of oestrus cow serum on the in vitro maturation and fertilization of bovine follicular oocyte*. Theriogenology, **31**, 693.
18. **Schellander K, Fuhrer F, Brackett BG, Korb H, Schleger W** (1991): *In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with oestrus cow serum*. Theriogenology, **33**, 477-485.
19. **Shamsuddin M, Larsson G, Rodriguez-Martinez H** (1993): *Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions*. Anim Reprod Sci, **31**, 49-60.
20. **Telfer EE** (1998): *In vitro models for oocyte development*. Theriogenology, **49**, 451-460.
21. **Trounson A** (1992): *The production of ruminant embryos in vitro*. Anim Reprod Sci, **28**, 125-137.
22. **Vergos E, Alifakiotis T, Konstandidou M, Gordon AC** (1993): *Embryo production by in vitro techniques in dairy cattle*. Vet Rec, **133**, 70.