

## Sığır oositlerinin in vitro maturasyonuna follikül uyarıcı hormon ve insan menopozal gonadotropininin etkisi\*

Hasan Ceyhun MACUN<sup>1</sup>, Mustafa KAYMAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kırıkkale.

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara .

**Özet:** Bu çalışmanın amacı; benzer gonadotropinlere göre daha ucuz olan ve kolay bulunabilen FSH (Follikül Uyarıcı Hormon) ve hMG (İnsan Menopozal Gonadotropini) hormonlarının sığır oositlerindeki in vitro maturasyon oranlarına etkisinin araştırılmasıdır. Oositlerin in vitro maturasyonu sırasında vasatlara eklenen hormonlara göre; FSH kullanılan Grup 1, hMG kullanılan Grup 2 ve kontrol grubu (Grup 3) olmak üzere 3 grup oluşturuldu. In vitro maturasyondan sonra, Grup 1’de Giemsa ile boyaması yapılan oositlerin %14.36’sının GV (Germinal Vezikül), %6.38’inin M I (Metafaz I), %76,07’sinin M II döneminde olduğu belirlenirken, %3.19’unun dejenere olduğu tespit edildi. Bu durum 2. ve 3. Grupta sırasıyla %11.40; %15.54; %66.84; %6.22 ve %23.03; %6.06; %64.24; %6.67 olarak belirlendi. Gruplarda oluşan dağılımların birbirinden farklı olduğu tespit edildi (p<0.05). Grup 1’de M II’ye ulaşan oositin fazla ve dejenere oositin az olması nedeniyle FSH’nın avantaj oluşturduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, sığır oositlerinin in vitro maturasyonunda vasat katkı maddesi olarak FSH kullanımının hMG’ye göre daha başarılı olduğu belirlendi. Bununla birlikte, sığır oositlerinin in vitro maturasyonu için en uygun ortam sağlanana kadar, farklı dozlarda FSH ve hMG hormonlarını da içeren vasat ve katkı maddeleri üzerine yapılan çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: Follikül uyarıcı hormon, insan menopozal gonadotropin, in vitro maturasyon, oosit, sığır

### The effect of follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropin on in vitro maturation of bovine oocytes

**Summary:** The aim of this study was to investigate the effects of FSH (Follicle Stimulating Hormone) and hMG (human Menopausal Gonadotropin) which are both easy to obtain and cheap when compared to other gonadotropins, on in vitro maturation of bovine oocytes. According to hormone added to in vitro maturation media, three groups were formed; Group I (FSH), Group II (hMG) and Group III (Control). After the in vitro maturation, Giemsa staining of oocytes in group I revealed that 14.36% of oocytes were at GV (Germinal Vesicle) stage, 6.38% of oocytes were at M I (Metaphase I) stage and 76.07% of oocytes were at M II stage while 3.19% of oocytes were degenerated. The percentages of oocytes at stages GV, M I, M II and degenerated oocytes in groups II and III were 11.40%, 15.54%, 66.84%, 6.22% and 23.03%, 6.06%, 64.24%, 6.67% respectively. Distribution of oocytes into different stages within the groups was significantly different (p<0.05). The higher number of M II stage oocytes and the lower number of degenerated oocytes in group I reveals the advantage of FSH supplementation. In conclusion, the use of FSH as a media supplement in in vitro maturation of bovine oocytes is more successful than the use of hMG. In addition, more studies concerning media and supplements used in in vitro maturation of bovine oocytes, which include different doses of FSH and hMG, are needed until best results obtained.

Key words: Bovine, follicle stimulating hormone, human menopausal gonadotropin, in vitro maturation, oocyte.

### Giriş

Sığırlarda in vitro fertilizasyonun (IVF) başarıldığı 1980’li yılların başından beri, oosit maturasyonu ile başlaya

İN vivo matüre olmuş oositlerle, kültürde matüre edilen oositler arasında farklar olduğu bildirilmiştir. İn vivo LH (Luteinleştirici Hormon) dalgasını takiben elde edilen oositlerde daha yüksek oranda gelişme potansiyeli olduğu saptanmıştır. İn vitro ve in vivo matüre edilen oositlerin sitoplazmik yeteneklerinde de farklılık olduğu belirlenmiştir. Gözlenen bu değişikliklerin oosite ait gelişim yeteneği ve kullanılan kültür şartları olmak üzere iki şekilde açıklanabileceği bildirilmiştir (24).

kisi-  
nin yetersizliğinden kaynaklanabilmektedir (30).

\* Aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

İn vitro embriyo üretim oranı, in vivo embriyo üretimine göre oldukça düşüktür. İn vitro embriyo üretiminde, kumulüs oosit komplekslerinin (KOK) blastosist aşamasına ulaşabilme başarısının %20-30 arasında olduğu bildirilmektedir (26,29). Bunun yanında in vitro embriyo üretiminde en kritik adımın in vitro maturasyon (IVM) olduğu ve uygun maturasyon şartları bulunmadan in vitro embriyo üretim başarısının in vivo üretime ulaşamayacağı bildirilmektedir (29).

Gonadotropinler; gap junctionlarda inhibitör maddelerin yapısını bölerek mayozun tekrar başlamasını uyarmakta ve ayrıca kumulüs hücrelerinin metabolizmasını değiştirmektedir. İn vivo olarak oositlerde maturasyonu gerçekleştiren spesifik uyarıcı, preovulatorik gonadotropin salınımıdır (22). Gonadotropinlerin preovulatorik salınımlarının etkilerinden biri de granuloza hücrelerinin mayozu durdurucu etkilerini baskılamaktır. Vasatlarda yüksek oranlarda FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) ve LH bulunması mayozun ve sitoplazmik maturasyonun yeniden başlamasına izin vermektedir (20). Ayrıca LH, oositlerin enerji kaynağı olarak kullandığı adenozin trifosfatın (ATP) kullanılabilirliğini artırmaktadır (3,25).

İnsan menopozal gonadotropini (hMG); menopoz dönemindeki kadınların ve ovariohistektomi geçiren kadınların idrarında belirlenmektedir. Follikül uyarıcı hormon ve LH etkisi olan bu hormon beşeri hekimlikte folliküler gelişimi sağlamak için kullanılmaktadır. Diğer taraftan PMSG'nin (Gebe Kısırak Gonadotropini) daha etkili olmasından dolayı veteriner biyoteknoloji alanında yeterince uygulama alanı bulamamıştır (7,18).

Veteriner reproduktif biyoteknoloji alanında in vitro yöntemle ticari embriyo üretim sürecinde en kritik evreyi maturasyon oluşturmaktadır. Maturasyon oranlarını artırmak amacıyla vasatlara eklenen katkı maddelerinin oluşturduğu dezavantajları (pahalılık, kolay temin edememe) ortadan kaldırmaya yönelik yeni katkı maddeleri araştırılmaktadır. Sunulan çalışmanın amacı ise benzer gonadotropinlere göre daha ucuz olan ve kolay bulunabilen FSH ve hMG hormonlarının sığır oositlerindeki in vitro maturasyon oranlarına etkisinin araştırılmasıdır.

## Materyal ve Metot

### Ovaryumların toplanması ve laboratuvara getirilmesi

Çalışmada kullanılan ovaryumlar, mezbahada kesilen inek ve düvelerden sağlandı. Taşıma vasatı olarak mililitresinde 100 IU penisilin bulunan %0.9'luk NaCl kullanıldı. Bu vasat 30-35 °C'ye ayarlandı ve ovaryumların karkasdan alınmasından oositlerin maturasyon kültürüne eklenmesine kadar olan sürenin 6 saati geçmemesine özen gösterildi.

### Folikül aspirasyonu ve oosit seleksiyonu

Aspirasyon işlemi ucuna 18 G'luk iğneler takılmış 10 ml'lik plastik enjektörlerle gerçekleştirildi. İki- 7 mm'lik periferik folliküller aspirasyon için tercih edildi. Toplanan follikül sıvıları dibi konik olan santrifüj tüplerinde biriktirildi. Oositlerin dibe çökmesi için bu tüpler 39 °C'ye ayarlanmış etüvlerde 5-10 dakika süre ile bekletildi.

Tüpteki oositler plastik petrilere alınarak seçme işlemi yapıldı. Seçme işlemi stereo mikroskop (20X80) altında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılacak oositler, Brackett ve Zuelke'nin (3) tarif ettiği şekilde seçildi. Zona pellusidasi sağlam, sitoplazması bir örnek kumlu görümlü, çevresinde sıkı şekilde 4 ve daha yukarı kumulüs hücre katı bulunan I. kalite oositler kullanıldı. Diğer oositler çalışma gruplarına alınmadı.

### Deney düzeniği

Çalışmada üç değişik grupta, toplam 556 adet (Grup 1: 191, Grup 2: 197, Grup 3: 168) oositin maturasyonu denendi. Grup 1'de FSH'nın, Grup 2'de hMG'nin maturasyona etkisi araştırıldı. Grup 3'de ise TCM 199'da (Doku Kültürü Vasatı 199) katkı maddesi olmadan maturasyon yapıldı.

*Grup 1:* Bu grupta, Hepes'li (25 mM) TCM 199 vasatına 25 µg/ml dozunda FSH (Folltropin -V, Vetrepharm, Kanada) ilave edildi.

*Grup 2:* Hepes'li (25 mM) TCM 199 vasatına 0,1 IU/ml hMG (Pergonal, Serono®, İsviçre) ilave edildi.

*Grup 3 (kontrol):* Hiçbir hormon katkısı olmaksızın sadece Hepes'li (25 mM) TCM 199 vasatı kullanıldı. Bu vasat; Sigma M 2520 katalog numaralı toz vasatın 1 litre ultra saf su ile sulandırılmasıyla oluşturuldu. Vasatın sulandırılması sırasında 2.2 gram sodyum bikarbonat (Sigma S 5761, 2.2 mg/ml) eklendi. Daha sonra 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanılarak pH 7.2'ye ayarlandı. Vasat, sulandırma işleminden sonra sırasıyla 0.45 µm'lik ve 0.22 µm'lik mikrofiltrelerden geçirilerek 50 ml'lik steril şişelere bölündü. Şişeler +4 °C'de saklandı ve bir ay içerisinde tüketildi.

### Maturasyon vasatlarına uygulanan son işlemler

Gruplarda yer alan IVM vasatlarının tümüne, kullanılmadan bir gece önce antibiyotik-antimikotik, Na pürivat, L-Glutamin ve FCS (Fötal Buzağı Serumu) eklendi. Antibiyotik-antimikotik olarak mililitresinde 10 000 IU penisilin, 10 mg streptomisin ve 25 µg amphoteresin B bulunan solüsyon (Sigma A 5955) kullanıldı. Bu solüsyondan vasatın mililitresinde 100 IU penisilin, 100 µg streptomisin ve 0.25 µg amphoteresin B olacak şekilde dozlama yapıldı. Ayrıca Na pürivat 22 µg/ml (Sigma P 4562) ve L-Glutamin 0.15 mg/ml (Sigma G 6392) dozlarında eklendi. Isı ile inaktive edilmiş (56 °C'de 30 dakika) FCS (Sigma N 4762) ise %10 (hacim/hacim) oranında kullanıldı.

### Equilibasyon ve kültür şartları

Tüm gruplarda kullanılan vasatlar, oositlerin maturasyonuna başlamadan 4 saat önce %5 CO<sub>2</sub>'li atmosferde, 39 °C'de ve maksimum nem ortamında equilibasyona bırakıldı. Equilibasyon işleminin sonunda vasatların pH'sının 7-7.3 olup olmadığı kontrol edilerek oositler maturasyona alındı.

Yirmi- 50 oosit, küçük bir vasat damlasının (yaklaşık 0.5 ml) içine alınarak steril mineral yağ (Sigma M 8410) altında inkubasyona alındı. Maturasyon; 39 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li atmosferde, maksimum nem içeren ortamda gerçekleştirildi. Kültüre 24 saat sonra son verildi.

### Kumulus ekspansiyonunun değerlendirilmesi

Süre bitiminde oositler kumulus ekspansiyonu açısından stereo mikroskopta incelendi. Oositler kumulus ekspansiyonu açısından Gordon'un (8) bildirdiği kriterlere göre üç aşamada değerlendirildi. Birinci aşamaya gözle görülebilir genişleme sağlayamayanlar, 2. aşamaya kısmi ekspansiyon yapanlar ve 3. aşamaya ise tamamen ekspansiyon gerçekleştirenler dahil edildi.

### Oositlerin boyanması

Tripsin solüsyonu (%0.02) ile çıplaklaştırılan oositlerin Giemsa ile boyanması; Ocana ve ark.'na (19) benzer şekilde yapıldı. Bu amaçla, oositler taze hazırlanmış %0.9 Na sitrat solüsyonunda 15 dakika bekletilerek, kromozomların şişmesi sağlandı. Daha sonra oositlerin, asetik asit ve metanol (1:1) karışımında 5 dakika bekletilmesiyle zona pellusidaları inceltilti. Oositler, daha sonra 1:3'lük asetik asit ve metanol solüsyonunda 24 saat süre ile tespit edildi. Tespit işleminden sonra oositler, stok Giemsa solüsyonu ile 20-25 saniye boyandı.

### Nükleer maturasyonun belirlenmesi

Hazırlanan preparatlar; Germinal vezikül aşaması (GV), Metafaz I (GVBD, Germinal Vezikül Parçalanması), Metafaz II ve dejenerasyon olmak üzere, Ocana ve ark.'nın (19) tarif ettiği şekilde 4 gruba ayrıldı. Bozulmamış nükleer membranı olan, aktif kromozomların belirlenemediği oositler GV aşamasında; nükleer membranı parçalanmış, mayozun başladığının göstergesi olan kromozomların tespit edildiği oositler ise metafaz I (M I) aşamasında kabul edildi. Maternal kromozomlarla kutup cisimciğinin belirlendiği oositler M II grubuna alındı. Son olarak; vakuollü sitoplazması, dağılmış şekilde kromozom yapısı olanlar dejenerasyon grubuna alındı.

### İstatistiki değerlendirme

Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak ki-kare testi ile (SPSS 10.0) değerlendirildi.

## Bulgular

### Aspirasyon işlemi ve toplanan oositler

Çalışmanın materyali toplam 321 ovaryumdan sağlandı ve bu ovaryumlardan toplam 2514 adet follikül

aspirasyonu gerçekleştirildi. Aspirasyon işlemi sonucunda 556 adet iyi kalitede oosit toplandı.

### Kumulus ekspansiyonu

Maturasyon süresi sonunda gruplarda oluşan kumulus ekspansiyon oranları Tablo 1'de özetlendi. Gruplar arasında farklılığın istatistiki olarak önemli olmadığı gözlemlendi ( $p < 0.065$ ).

Tablo 1. Gruplarda görülen kumulus ekspansiyon oranları.  
Table 1. The rates of cumulus expansion in groups.

Kumulus Ekspansiyonu	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Tam (n) %	(160) 83.77	(171) 86.80	(131) 77.98
Kısmi (n) %	(18) 9.42	(19) 9.65	(29) 17.26
Yok (n) %	(13) 6.81	(7) 3.55	(8) 4.76
Toplam Oosit (n)	191	197	168

Ki-kare= 8.839;  $p < 0.065$

### Nükleer maturasyon bulguları

Çıplaklaştırılan oositlerin fiksasyonu ve boyanması sırasında, zona pellusidalarda meydana gelen incelmelere bağlı olarak 1. grupta 3, 2. grupta 4 ve 3. grupta ise 3 adet oosit kayboldu. Bu nedenle Grup 1'de 188, Grup 2'de 193 ve Grup 3'de 165 adet oosit boyanarak değerlendirmeye alındı ve gruplarda oluşan nükleer maturasyon bulguları Tablo 2'de özetlendi. Gruplarda oluşan dağılımların istatistiki olarak birbirinden farklı olduğu tespit edildi ( $p < 0,001$ ).

Tablo 2. Gruplarda görülen nükleer maturasyon sonuçları.  
Table 2. The results of nuclear maturation in groups.

IVM Sonuçları	Grup 1	Grup 2	Grup 3
GV (n) %	(27) 14,36	(22) 11,40	(38) 23,03
GVBD- M I (n) %	(12) 6,38	(30) 15,54	(10) 6,06
M II (n) %	(143) 76,07	(129) 66,84	(106) 64,24
Dejenere (n) %	(6) 3,19	(12) 6,22	(11) 6,67
Toplam Oosit (n)	188	193	165
İkili karşılaştırma	a	b	c

Ki-kare= 23.847;  $p < 0,001$

a,b,c: Farklı harf taşıyan gruplar arası fark istatistik olarak önemli ( $p < 0.05$ ).

## Tartışma ve Sonuç

Kumulus hücrelerinin, gonadotropinler ve büyüme faktörleri tarafından uyarılmasıyla hiyaluronik asit üretilmekte ve kumulus ekspansiyonu olarak adlandırılan hücrelerde çözümler meydana gelmektedir (8). Benzer şekilde LH, FSH, TSH (Tiroid Uyarıcı Hormon) hormonlarıyla kumulus ekspansiyonunun arttığı (32); büyüme hormonu salınım hormonu (GH-RH) ve vazoaaktif

intestinal peptit (VIP) kullanımıyla etkilenmediği (2) ve polivinil alkol (PVA) (12), fetuin eklenmesiyle azaldığı (12) ve etkilenmediği (28) bildirilmiştir. Sunulan çalışmada ise FSH eklenen Grup 1 (%83.77) ve hMG eklenen Grup 2'deki (%86.80) oositler kontrol grubundan (%77.98) daha fazla ekspansiyon göstermelerine rağmen istatistik olarak fark bulunmaması ( $p>0.05$ ), Gordon'un (8) bulgularıyla benzerlik göstermedi. Aynı şekilde Calder ve ark. (4), Gordon'dan (8) farklı olarak, 50 ng/ml'nin üzerinde kullanılan PGE<sub>2</sub>'nin (Prostaglandin E) kumulus ekspansiyonunu uyardığını bildirmişlerdir.

Luciano ve ark. (16) yaptıkları bir çalışmada, hMG'nin kumulus ekspansiyonunu artırdığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde Choi ve ark. (5), FSH ve LH'nin birlikte kullanımlarını ayrı ayrı kullanımlarına göre daha başarılı bulmuşlardır. Sunulan çalışmada ise FSH etkisinin yanında LH etkisi de olan hMG'nin diğer iki gruptan farklı bulunmaması, adı anılan araştırmacıların bulgularını desteklememiştir.

Gonadotropik hormon bulunmayan 3. grupta; %77.98 oranında tam, %17.26 oranında kısmi kumulus ekspansiyonu görülmesi, vasatta bulunan FCS'ye bağlanmıştır. Fötal buzağı serumunun hormon ve büyüme faktörleri ihtiva ettiği bir çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir (14,19,20,22).

Kumulus ekspansiyon oranlarını Çetin (6) %95.14, Lorenzo ve ark. (15) %74.2 ve %75.9, Liu ve ark. (14) %80 ve %86 olarak tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada ortaya çıkan kumulus ekspansiyon oranları; Çetin'in (6) elde ettiği sonuçlardan düşük, Lorenzo ve ark.'nın (15) elde ettiği sonuçlardan yüksek, Liu ve ark.'nın (14) sonuçlarına da benzer bulunmuştur. Çetin (6), yaptığı çalışmada vasata FSH ve östradiol eklemiştir. Lorenzo ve ark. (15), EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) ve IGF-I'ı (İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü) katkı maddesi olarak kullanmışlardır. Liu ve ark. (14) ise FSH, LH ve östradiölü vasata eklemiştir. Kumulus ekspansiyonlarında görülen bu farklılıkların, eklenen değişik katkı maddelerine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda elde edilen kumulus ekspansiyon oranları, metafaz II'ye ulaşan oosit oranlarından farklı bulunmuş ve bu nedenle kumulus ekspansiyonunun tek başına maturasyon kriteri olarak kullanılamayacağı kanısına varılmıştır. Benzer şekilde bazı araştırmacılar da kumulus ekspansiyonunun tam bir maturasyonu ifade etmediğini bildirmişlerdir (8,11). Bu durumun sebebi ise kumulus ekspansiyonunun bazen oosit maturasyonundan bağımsız olarak gerçekleşmesine bağlanmaktadır (8).

Sunulan çalışmada; oositlerin boyanmasıyla elde edilen nükleer maturasyon sonuçlarını istatistiksel yönden karşılaştırdığımızda, gruplarda oluşan dağılımların birbirlerinden farklı olduğu gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Grup 1'de oositlerin %14.36'sında, Grup 2'de oositlerin

%11.40'ında ve Grup 3'de oositlerin %23.03'ünde mayoz bölünmenin hiç başlamadığı belirlenmiştir. Diğer taraftan gruplarda sırasıyla %6.38, %15.54 ve %6.06 oranlarında maturasyonun başladığı, ancak tamamlanmadığı (GVBD-M I) tespit edilmiştir. Grup 2'de diğer gruplara göre düşük düzeyde GV, yüksek düzeyde GVBD-M I aşamasında oosit görülmesi vasatta hMG'nin yetersiz miktarda olabileceğini düşündürmektedir. Germinal vezikül aşamasındaki oositlerin Grup 3'de en yüksek seviyede belirlenmesi, mayozun tekrar başlatılmasında gonadotropik hormonların etkili olduğunu bildiren Younis ve ark. (31), Greve ve Madison (9), Trounson (27), ve Sirard ve Blondin'in (24) sonuçlarını destekledi. Gruplarda sırasıyla %76.07, %66.84 ve %64.24 oranlarında M II'ye ulaşıldığı ve yine sırasıyla %3.19, %6.22 ve %6.67 oranlarında dejenerasyon tespit edildi. Vasatta FSH kullanımının dejenerasyonu azalttığı kanısına varıldı.

İn vitro maturasyon vasatlarında FSH kullanan bazı araştırmacılar, %60.6 ile %85 oranları arasında M II'ye ulaşan oositler olduğunu bildirmişlerdir (6,17,22). Sonuçlardaki bu farklılıkların, kullanılan diğer katkı maddeleriyle (östradiol, östrustaki inek serumu gibi) ilişkili olduğu sanılmaktadır. Sunulan çalışmada vasata FSH eklenmesiyle M II'ye ulaşan oositlerde artış olması, FSH kullanımının IVM'yi etkilemediğini bildiren Beker ve ark.'nın (1) desteklememektedir.

Folikül uyarıcı hormon ve LH etkisi olan hMG, vasat katkı maddesi olarak pek kullanılmamaktadır. Bu nedenle, nükleer maturasyon sonuçları bildirilmemiştir. Folikül uyarıcı hormonun ve LH'nin birlikte kullanıldığı bazı çalışmalarda M II'ye ulaşan oosit oranı %32 ile %90.3 arasında değişmektedir (13,22,23). Bu çalışmalarda kültür şartları, serum, maturasyona koyulan oosit sayılarındaki değişkenlikler, IVM sonuçlarının sunulan çalışmaya göre farklı olması sağlanmıştır.

Çalışmamızda oluşan IVM sonuçlarıyla; hMG'nin sığır oositlerinde vasat katkı maddesi olarak kullanılması FSH'ya göre daha düşük başarı oranları sağladığı belirlenmiştir. Ancak hMG'nin az da olsa IVM'yi uyarması Rieger ve ark.'nın (21) bulgusuna benzerlik gösterdi. Rieger ve ark. (21), hMG'nin olumlu etkisini pirüvat metabolizmasını uyararak yaptığını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, sığır oositlerinin IVM'sinde vasat katkı maddesi olarak FSH kullanımının hMG'ye göre daha başarılı olduğu belirlendi. Diğer taraftan bu hormonların vasatlarda değişik dozlarda kullanımının araştırılması gerektiği kanısına varıldı. Ancak, sığır oositlerinin IVM'si için en uygun ortam sağlanana kadar vasat ve katkı maddeleri üzerine yapılan çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

### Kaynaklar

1. **Beker ARCL, Colenbrander B, Bevers MM** (2002): *Effect of 17 $\beta$  estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes*. Theriogenology, **58**, 1663-1673.
2. **Beker ARCL, Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM** (2000): *Effect of growth hormone releasing hormone (GHRH) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on in vitro bovine oocyte maturation*. Theriogenology, **53**, 1771-1782.
3. **Brackett BG, Zuelke KA** (1993): *Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos*. Theriogenology, **39**, 43-64.
4. **Calder MD, Caveney AN, Westhusin ME, Watson AJ** (2001): *Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE<sub>2</sub> induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro*. Biol Reprod, **65**, 135-140.
5. **Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE, Squires EL** (2001): *Effectes of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199*. Theriogenology, **56**, 661-670.
6. **Çetin Y** (2004): *İmmatür Sığır Oositlerinin Vitrifikasyon Tekniği ile Etilen Glikol ve Dmsö Kullanarak Payetlerde Dondurulması*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
7. **Döcke F** (1994): *Wirkungen der keimdrüsenhormone*. 418-508. In: F Döcke (Ed), Veterinärmedizinische Endokrinologie. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
8. **Gordon I** (1994): *Laboratory Production of Cattle Embryos*. CAB International, Wallingford.
9. **Greve T, Madison V** (1991): *In vitro fertilization in cattle: a review*. Reprod Nutr Dev, **31**, 147-157.
10. **Greve T, Madison V, Avery B, Callesen H, Hyttel 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.
11. **Kaya ZP, Ün M** (2003): *Sığır oositlerinin in vitro maturasyonunun belirlenmesinde kullanılan kriterlerin etkinliğinin karşılaştırılması*. I. Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi Konya, 62.
12. **Landim AFC, Boyazoglu SEA, Carvalho LR, Choi YH, Squires EL, Seidel GE** (2002): *Effects of fetuin on zona pellucida hardening, fertilization and embryo development in cattle*. Anim Reprod Sci, **71**, 181-191.
13. **Leibfried RML, Critser ES, Parrish JJ, First NL** (1989): *In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes*. Theriogenology, **31**, 61-74.
14. **Liu JM, Jin ZQ, Zhao XX, Zhu YD** (1991): *The development of bovine follicular oocytes matured in different culture media*. Vet Res Com, **15**, 257-260.
15. **Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M** (1995): *Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes*. Theriogenology, **44**, 109-118.
16. **Luciano AM, Modina S, Vassena R, Milanese E, Lauria A, Gandolfi F** (2004): *Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte*. Biol Reprod, **70**, 465-472.
17. **Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S** (2000): *Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation*. Hum Reprod, **15**, 11-17.
18. **Niemann H, Meinecke B** (1993): *In vitro produktion von embryonen*. 86-103. In: H Niemann, B Meinecke (Ed), Embryotransfer und Assoziierte Biotechniken bei Landwirtschaftlichen Nutztieren. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
19. **Ocana QJM, Merlin MP, Ortega MM, Millan MM** (1999): *The effect of different sera and bovine serum albumin fraction (BSA) on in vitro maturation of immature bovine oocytes*. Arch Zootec, **48**, 167-174.
20. **Ocana QJM, Millan MM, Cordoba MV, Franganillo AR** (1994): *The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes in vitro*. Theriogenology, **41**, 405-411.
21. **Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F** (1998): *The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro*. J Reprod Fertil, **112**, 123-130.
22. **Sanbuissho A, Threlfall WR** (1990): *The influence of serum and gonadotropins on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes*. Theriogenology, **34**, 341-348.
23. **Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez MH** (1993): *Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions*. Anim Reprod Sci, **31**, 49-60.
24. **Sirard MA, Blondin P** (1996): *Oocyte maturation and IVF in cattle*. Anim Reprod Sci, **42**, 417-426.
25. **Soom AV, Kruif AD** (1996): *Oocyte maturation, sperm capacitation and pre-implantation development in the bovine: Implications for in vitro production of embryos*. Reprod Dom Anim, **31**, 687-701.
26. **Thompson JG** (1997): *Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants*. Reprod Fertil Dev, **9**, 341-354.
27. **Trounson A** (1992): *The production of ruminant embryos in vitro*. Anim Reprod Sci, **28**, 125-137.
28. **Ün ZP** (2002). *Östrustaki Sığır Serumu ve Fetuin'in Sığır Oositlerinin in vitro Maturasyonu Üzerine Etkileri*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
29. **Wit AAC, Wurth YA, Kruif AM** (2000): *Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex*. J Anim Sci, **78**, 1277-1283.
30. **Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PEJ, Presicce GA** (1998): *Control of oocyte maturation in cows-biological factors*. Theriogenology, **49**, 471-482.
31. **Younis AI, Brackett BG, Fayrer HRA** (1989): *Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro*. Gamete Res, **23**, 189-201.
32. **Zuelke KA, Brackett BG** (1992): *Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured in vitro*. Endocrinology, **131**, 2690-2696.

Geliş tarihi : 28.02.2005 / Kabul tarihi : 30.05.2005

#### Yazışma adresi:

Prof.Dr.Mustafa Kaymaz  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı,  
06110 Dışkapı/Ankara