

757521

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR OOSİTLERİNİN İN VİTRO MATURASYONUNA
FOLLİKÜL UYARICI HORMON ve İNSAN
MENOPOZAL GONADOTROPİNİ'NİN ETKİSİ**

Hasan Ceyhun MACUN

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ

2004 - ANKARA

T.C.
Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Doğum ve Jinekoloji Doktora Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi : 17.12.2004



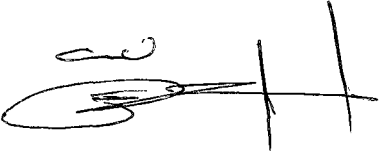
Prof.Dr.Hakkı İZGÜR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof.Dr.Şükrü KÜPLÜLÜ
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr.Armağan ÇOLAK
Atatürk Üniversitesi
Raportör



Prof.Dr.Hikmet ALTUNAY
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr.Mustafa KAYMAZ
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Follikül Gelişimi ve Oosit Seleksiyonu	2
1.2. Oosit Maturasyonu	5
1.2.1. Nükleer Maturasyon	7
1.2.2. Sitoplazmik Maturasyon	9
1.2.2.1. Mitokondrial Organizasyon ve Aktivitesi	10
1.2.2.2. Enerji Kaynakları ve Metabolik Döngü	11
1.3. Oosit Kaynakları	11
1.3.1. Canlı Hayvanlardan Oosit Toplanması	12
1.3.1.1. Transvaginal Ultrasonografi Rehberliğinde Follikül Aspirasyonu	12
1.3.1.2. Laparoskopi Aracılığıyla Follikül Aspirasyonu	13
1.3.2. Mezbahadan Getirilen Ovaryumlardan Oosit Toplanması	14
1.3.2.1. Follikül Aspirasyonu	15
1.3.2.2. Follikül Diseksiyonu	16
1.3.2.3. Ovaryum Dilimleme Tekniği	16
1.3.2.4. Doku Eritme Tekniği	17
1.3.2.5. İn Vitro Follikül Kültürü	17
1.4. İn Vitro Maturasyonu Etkileyen Faktörler	18
1.4.1. Yaş	19
1.4.2. Follikül ve Oosit Çapı	19
1.4.3. Oosit Kalitesi	21
1.4.4. Oosit Toplama Tekniği	22
1.4.5. Östrus Siklusu	23

1.4.6. In Vitro Maturasyon Vasatları	24
1.4.7. In Vitro Maturasyonda Kullanılan Vasat Katkı Maddeleri	26
1.4.7.1. Hormonlar	26
1.4.7.2. Serumlar	33
1.4.7.3. Büyüme Faktörleri	35
1.4.7.4. Hücreler	36
1.4.7.5. Sığır Follikül Sıvısı (bFF)	38
1.4.7.6. Sığır Serum Albumini (BSA)	40
1.4.7.7. Sığır Amnion Sıvısı (bAF)	40
1.4.7.8. Diğer Katkı Maddeleri	40
1.4.7.9. Bazı Vasat Katkı Maddelerinin Karşılaştırılması	41
1.4.8. Kültür Şartları	42
1.5. Maturasyonun Belirlenmesi	43
2. GEREÇ ve YÖNTEM	44
2.1. Ovaryumların Toplanması ve Laboratuvara Getirilmesi	44
2.2. Follikül Aspirasyonu ve Oosit Seleksiyonu	44
2.3. Deney Düzenegi	45
2.4. Maturasyon Vasatlarına Uygulanan Son İşlemler	46
2.5. Equilibrasyon ve Kültür Şartları	46
2.6. Kumulus Ekspansiyonunun Değerlendirilmesi	47
2.7. Oositlerin Soyulması ve Kutup Cisimciğinin Aranması	47
2.8. Oositlerin Boyanması	47
2.9. Nükleer Maturasyonun Belirlenmesi	48
2.10. İstatistiki Değerlendirme	48
3. BULGULAR	49
3.1. Ovaryumların Toplanması	49
3.2. Aspirasyon İşlemi ve Toplanan Oositler	49
3.3. Equilibrasyon	50
3.4. Kumulus Ekspansiyonu	50
3.5. Kutup Cisimciği	51
3.6. Nükleer Maturasyon Bulguları	53

4. TARTIŞMA	56
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	63
ÖZET	65
SUMMARY	66
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	74



ÖNSÖZ

Biyoteknolojik çalışmalar içerisinde yer alan in vitro fertilizasyon; dişi ve erkek gametlerin laboratuvar ortamında biraraya getirilmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Sığır oositlerinin in vitro fertilizasyonuna 1970'li yıllarda başlanmıştır ve bu teknikle ilk buzağı doğumu 1981 yılında gerçekleştirilmiştir. Üremenin daha verimli hale getirilmesi amacıyla, geliştirilmeye çalışılan bu teknik, halen istenilen düzeyde değildir ve elde edilen başarılar bir örneklik arz etmemektedir. Bu nedenle en kritik aşamayı oluşturan in vitro maturasyon üzerine daha fazla eğilmek gerekmektedir. Sunulan çalışmada; in vitro maturasyon için önemli hedeflerden biri olan optimum vasatı oluşturmaya katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Doktora programım boyunca yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi ve elemanlarına, istatistiğe yardımcı olan Biometri Anabilim Dalı öğretim elemanlarına, oositleri boyamamda yardımcı olan Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY'a, laboratuvardaki işbirliğinden dolayı Dr. Yunus ÇETİN'e, vasat hazırlanmasında yardımcı olan Dr. Musa ALKAN'a ve materyal sağlanmasında yardımcı olan Çubuk ilçe mezbahasındaki meslekdaşlarıma şükranlarımı sunarım. Ayrıca çok değerli aileme, her konuda desteğini hissettiğim eşime ve aramıza yeni katılan oğluma teşekkürü borç bilirim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
>	Büyüktür
<	Küçüktür
ACS	Anöstrustaki inek serumu
ark.	Arkadaşları
ATP	Adenozin trifosfat
bAF	Siğır amnion sıvısı
bFF	Siğır follikül sıvısı
bFGF	Temel fibroblast benzeri büyüme faktörü
BSA	Siğır serum albumini
BsFF	Sentetik siğır follikül sıvısı
Ca	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CL	Korpus luteum
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
DAPI	4,6 diamino-2-phenylindole
E ₂	Östrojen
ECS	Östrustaki inek serumu
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FCS	Fötal buzağı serumu
FSH	Follikül uyarıcı hormon
G	Gauge
GFG	Büyüme farklılaşma faktörü
GH	Büyüme hormonu
GHRH	Büyüme hormonu salınım hormonu
GnRH	Gonadotropin salınım hormonu
GV	Germinal vezikül
GVBD	Germinal vezikül parçalanması
hCG	İnsan koriyonik gonadotropini
HCl	Hidroklorik asit
Hepes	N-(2 hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2 ethanesulphonicacid)
hMG	İnsan menopozal gonadotropini
IGF	İnsulin benzeri büyüme faktörü
IU	International ünite
IVF	İn vitro fertilizasyon
IVM	İn vitro maturasyon
KD	Kilodalton
kg	Kilogram
KOK	Kumulus oosit kompleksi
KRB	Krebs medium
l	Litre

LH	Luteinleştirici hormon
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μmol	Mikromolar
M I	Metafaz 1
M II	Metafaz 2
MEM	Minimum essansial medium
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
MHz	Megahertz
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mmHg	Milimetreciva
mOsm	Miliozmolarite
mRNA	Mesanger ribonükleik asit
N	Normal
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NCS	Yeni doğan buzağı serumu
ng	Nanogram
NGFs	Sinirsel büyüme faktörleri
nmol	Nanomolar
OGS	Östrustaki keçi serumu
PBS	Fosfatlı tampon solüsyon
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PGE	Prostaglandin E
pH	Asitlik sabiti
PHA	Fitohemaglutinin
PMSG	Gebe kısrak gonadotropini
PRL	Prolaktin
PVA	Polivinil alkol
PWM	Pokeweed mitojen
RU486	Mifeprison
TALP	Tyrode'nin albumin laktat pürivat vasatı
TCA	Trikarboksilik asit
TCM	Doku kültürü vasatı
TGFs	Transforming büyüme faktörleri
TSH	Tiroid uyarıcı hormon
VEGF	Vasküler epitelial büyüme faktörü
VIP	Vazoaktif intestinal peptit

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. İyi (siyah oklar) ve kötü (beyaz oklar) kalitede oositler. x40.....	49
Şekil 3.2. Gruplarda görülen kumulüs ekspansiyon oranlarının grafiği.....	51
Şekil 3.3. A. Kumulüs ekspansiyonunun görülmediği (I) ve kısmi (II) olarak görüldüğü oositler. x60. B. Tam kumulüs ekspansiyonu. x60.....	51
Şekil 3.4. Gruplarda belirlenen I. kutup cisimciği oranlarının grafiği.....	52
Şekil 3.5. A. Perivitellin boşluğunda I. kutup cisimciği (ok) belirlenen oosit. x80. B. Kutup cisimciği belirlenemeyen oositler. x60.....	52
Şekil 3.6. Sodyum sitrat solüsyonunda şişen oositler. x60.....	53
Şekil 3.7. Nükleer maturasyon sonuçlarının gruplara göre dağılımının grafiği.....	54
Şekil 3.8. Fiksasyon solüsyonlarında zona pellusidaları incelenen oositler. x60.....	54
Şekil 3.9. A. Germinal vezikül aşaması. x200. B. Kromozomların (ok) saptanmasıyla belirlenen Metafaz I aşaması. x400. C. Kutup cisimciğindeki kromozomların (I) ve maternal kromozomların (II) belirlendiği Metafaz II aşaması. x400. D. Sitoplazmasında kromozomların (oklar) dağıldığı dejenere oosit. x200.....	55

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Küçük, orta ve büyük folliküllerden alınan oositlerin gelişim yetenekleri (Yang ve ark., 1998).....	21
Çizelge 1.2. Orta ve çok küçük folliküllerden alınan oositlerin gelişim yetenekleri (Yang ve ark., 1998).....	21
Çizelge 3.1. Gruplarda görülen kumulüs ekspansiyon oranları.....	50
Çizelge 3.2. Gruplarda belirlenen I. kutup cisimciği oranları.....	52
Çizelge 3.3. Nükleer maturasyon sonuçlarının gruplara göre dağılımı.....	53

1. GİRİŞ

Sığırlarda in vitro fertilizasyonun (IVF) başarılı olduğu 1980'li yılların başından beri, oosit maturasyonu ile başlayan bu prosedürün mekanizmalarını anlayabilmek için oldukça çaba sarf edilmektedir (Greve ve ark., 1993; Yang ve ark., 1998). Fertilizasyondan sonra gelişimin sağlanabildiği embriyolarda, maturasyonda bir çok biyolojik faktör etkili olmaktadır. Oosit maturasyonundaki eksiklikler; uygun olmayan nükleer veya sitoplazmik maturasyondan ya da her ikisinin yetersizliğinden kaynaklanabilmektedir (Yang ve ark., 1998).

In vitro fertilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi ikizlik, klonlama, gen transferi ve embriyonik ölümler üzerine yapılan çalışmalara destek sağlamıştır. Ayrıca genital problemi ve düşük seviyede süperovulasyon yeteneği olan inek veya düve oositlerinin ve çeşitli tipte infertilite problemlerine sahip boğaların spermatozoalarının kullanılması ile buzağı doğumları sağlanabilmiştir (Greve ve ark., 1993).

In vivo matüre olmuş oositlerle, kültürde matüre edilen oositler arasında farklar olduğu bildirilmiştir. In vivo LH (Luteinleştirici Hormon) dalgasını takiben elde edilen oositlerde daha yüksek oranda gelişme potansiyeli olduğu saptanmıştır. In 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 (Sirard ve Blondin, 1996).

In vitro embriyo üretim oranı, in vivo embriyo üretimine göre oldukça düşüktür. In vitro embriyo üretiminde, kumulus oosit komplekslerinin (KOK) blastosist aşamasına ulaşabilme başarısının %20-30 arasında olduğu bildirilmektedir (Thompson, 1997; Wit ve ark., 2000). 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 (Wit ve ark., 2000).

1.1. Follikül Gelişimi ve Oosit Seleksiyonu

Tüm memelilerde ovaryumlar, ventral mezonefrozda yer alan genital sırt (Stria genitalis) olarak adlandırılan iki kabarcıktan gelişmektedir. Vitellus kesesinin (yolk sac) kaudal duvarında, allantois kesesine yakın bölgeden köken alan germ hücreleri daha sonra genital sırtta göç ederler. Germ hücreleri gonadlara ulaştıklarında, gonadal somatik hücreler gibi mitoz yoluyla proliferasyon olmaktadır. Daha sonra genetik olarak dişi gonad, kortekste yer alan kordlar tarafından kuşatılarak oogonium adını alır. Oogonium grupları kordlarda somatik hücrelerle çevrili durumdadırlar (Hurk ve ark., 1997).

Memelilerde, germ hücrelerinin mitozu genellikle doğumdan önce tamamlanmaktadır. Sığır germ hücrelerindeki bu proliferasyon gebeliğin 7,5 ayına kadar gerçekleşmektedir. Mitotik süreçte, sığır ovaryumlarındaki germ hücreleri her fötüs için yaklaşık 2 milyon kadardır. Ancak bunların büyük çoğunluğu (%90-99) buzağının doğumuna kadar dejenere olmakta ve oldukça kısıtlı sayıda oosit (%1'den az) dejenere olmadan reproduktif yaşamda kullanılmaktadır (Hurk ve ark., 1997; Yang ve ark., 1998).

Mitotik proliferasyon tamamlandıktan sonra oogoniumlar mayoz bölünmeye başlar. Bu germ hücreleri, birinci mayoz bölünmenin profazının diploten aşamasında durur ve oosit adını alırlar. Daha sonra oositlerin kortikal hatlarından sıyrılması ile primordial follikül formasyonu şekillenir (Romero ve Seidel, 1996; Hurk ve ark., 1997). Fötüs ovaryumunda ilk follikül şekillenmesi gebeliğin 130. günü civarında gerçekleşmektedir (Mariana ve ark., 1991).

Fötal dönem de dahil olmak üzere ovaryumlar, primordial follikül havuzu olarak görev yapmaktadırlar. Bu folliküllerin her biri tek katlı yassılaştırmış somatik (granulosa) hücrelere (14-29 adet) sahip, mayozun profaz I aşamasında bulunan oositleri içermektedir (Soom ve Kruif, 1996; Hurk ve ark., 1997). Granulosa katmanı membranla çevrili durumdadır (Hurk ve ark., 1997). Folliküller kademeli olarak, gelişmeye başlamak için havuzu terk etmektedirler. Sığırlarda primordial follikül havuzundan her gün yaklaşık 6 follikül gelişmeye başlamaktadır. Bu gelişim süreci oosit ve follikül büyüklüğünün artmasıyla karakterizedir (Soom ve Kruif, 1996; Hurk ve ark., 1997). Primordial folliküllerin çapları 30-50 μm arasındayken içerdikleri oositlerin çapları 20-35 μm arasında bulunmuştur. Gelişen folliküller kademeli olarak kübik granulosa hücrelerine sahip olurlar ve primer folliküle dönüşürler. Primer folliküller; çevresinde çeşitli sayıda (27-50) granulosa hücreleri bulunduran 30-40 μm çaplı oositleri içeren, 40-60 μm 'lik folliküllerdir. Bu bulgular primer follikül aşamasında granulosa hücrelerinin yalnızca hacimce artmadığını aynı zamanda sayıca da arttığını göstermektedir (Hurk ve ark., 1997).

Granulosa hücrelerindeki proliferasyon sonucu, oosit I çevresinde çok katlı granulosa katmanı oluşmaktadır. Granulosa katmanı birden fazla olan folliküller sekonder follikül ismini almaktadır. Çiftlik hayvanlarında, sekonder folliküllerdeki granulosa katmanları 6'dan (sığır) 10'a (domuz) kadar değişmektedir ve sekonder folliküllerin ulaştıkları büyüklük sığırlarda 150 μm , domuzlarda 300 μm civarındadır. Sığırlarda, bu dönemde oosit l'in çapı 60 μm 'ye ulaşmaktadır. Ruminantlarda oositin l'in çapı, antral dönemin başına kadar yaklaşık 150 μm 'ye ulaşabilmektedir (Hurk ve ark., 1997).

Sığır oositlerinin gelişimlerinin primordial follikül döneminde, nükleer farklılaşma ile birlikte organel sayılarında da artma meydana gelmektedir. Kortikal granül formasyonu ve oosit ile granulosa hücreleri arasındaki gap junctionlar ilk kez sekonder follikül döneminde gerçekleşmektedir (Hurk ve ark., 1997).

Sekonder follikülün erken gelişim döneminde bağ doku fibrilleri, teka katmanını oluşturmak için granuloza altındaki bazal membrana paralel olarak düzenlenir. Glikoprotein yapısında olan zona pellusida bu dönemde, gelişmekte olan oosit ile en içteki granuloza tabakası arasında biçimlenmektedir. Bunlara ek olarak hormon üreten büyük epitel hücreler ve kapillar ağ da teka oluşumuna katılmaktadır. Sekonder follikülün oluşumundan sonraki bu yapıya preantral follikül denilmektedir. Takip eden antral dönemde, teka katmanında açıkça görülebilen artma ve ekspansiyon belirlenmektedir (Hurk ve ark., 1997).

Sığırlarda, preantral folliküllerdeki gelişim hızı, çapı 0,5 mm'den büyük olan antral folliküllere göre oldukça yavaştır. Östrus siklusunun folliküler döneminde antrumda folliküler sıvı birikimine bağlı olarak 2 gün içerisinde antral folliküller 10 mm'den daha fazla gelişebilmektedir (Hurk ve ark., 1997). Follikül gelişimi hem granuloza hücrelerindeki mitotik aktive ile hem de 0,14-0,28 mm'lik folliküllerde başlayan antrum formasyonu ile gerçekleşir (Gordon, 1994; Soom ve Kruif, 1996). Her östrus siklusunda, 3-6 follikülün uyarılarak 5 mm'nin üzerine çıktığı 2-3 folliküler dalga oluşmaktadır. Bu folliküllerden biri gelişimine devam ederek dominant folliküle dönüşmekte ve diğer subordinant folliküller regrese olmaktadır. Eğer luteal regresyon sırasında dominant follikül varsa ovulatorik follikül halini alarak matür bir oosit salar (Soom ve Kruif, 1996).

Follikül gelişiminde östradiol, ovulasyondan hemen önce LH ve ovulasyonda FSH (Follikül Uyarıcı Hormon) gibi zamana bağlı bir çok faktör etkili olmaktadır. Ayrıca LH salınımından sonra luteinize granuloza hücrelerinden progesteron salınmaktadır (Soom ve Kruif, 1996).

Follikül uyarıcı hormon granuloza hücrelerinin proliferasyonunda ve differasyonunda etkili olmaktadır. Primer, sekonder, antral folliküllerde bulunan granuloza hücrelerinde ve primordial folliküllerde bulunan oositlerde;

FSH reseptörlerinin ve FSH reseptör geninin var olduğu ve küçük folliküllerin gelişimi için bazal seviyede FSH'nın ve östradiolün gerekli olduğu tespit edilmiştir (Hurk ve ark., 1997).

Oosit gelişiminde ve maturasyonunda parakrin etkili peptidler, siklinler ve büyüme faktörleri de etkili olmaktadır (Soom ve Kruif, 1996; Hurk ve ark., 1997). Ayrıca follikül gelişimini aktivinler ve vazoaaktif intestinal peptit (VIP) de etkilemektedir. Protein yapıda olan aktivin ve inhibin, follikül gelişimini otokrin ve parakrin yoldan düzenlemektedir. Aktivin ve reseptörü primordial folliküllerdeki oositlerde ve granuloza hücrelerinde, inhibinin spesifik alfa-sub ünitisi ve mRNA'sı (Mesanger Ribonükleik Asit) ise antral folliküllerde belirlenmiştir (Hurk ve ark., 1997).

Büyüme faktörlerinden; epidermal büyüme faktörü (EGF), temel fibroblast benzeri büyüme faktörü (bFGF), transforming büyüme faktörleri (TGFs), vasküler epitelial büyüme faktörü (VEGF) ve sinirsel büyüme faktörleri (NGFs) follikülogeneziste rol almaktadırlar (Hurk ve ark., 1997) .

Bütün bu etkilerin altında, bir antral follikülün preovulatör follikül olması yaklaşık iki östrus siklusunda gerçekleşmektedir. İn vivo olarak iki siklustan fazla süren ve karmaşık bir yapısı olan follikül seleksiyonu ve oosit gelişimini in vitro olarak bir günde taklit etmek oldukça zordur (Soom ve Kruif, 1996).

1.2. Oosit Maturasyonu

Birçok hayvan türünde, oosit üretimi veya oogenezis erken fetal gelişim sırasında olmakta ve doğuma yakın dönemde tamamlanmaktadır. Germ hücrelerinden farklılaşan oositler; ovaryumlarda, gelişmeyen follikül stoğu olan primordial folliküllerde bulunur. Bazı primordial folliküllerin aktive olarak primer, sekonder follikül ve antral follikül gibi aşamalara ulaşmalarının mekanizmaları hala anlaşılammıştır. Sığırlarda, folliküler oluşum fetal

hayatta olmakta ve doğumdan hemen önce antral folliküller görülmektedir. Normal bir buzağıda; 120.000-150.000 adet primordial veya primer, 200-500 adet sekonder, 20-50 adet antral follikül şeklinde germ hücreleri dağılım gösterir (Yang ve ark., 1998).

Preovulatojik süreçte oosit, follikül içerisinde etrafı kumulus ve granuloza hücreleriyle kaplı olarak bulunur. Kumulus oosit kompleksi olarak adlandırılan bu yapıda, kumulus hücreleri ile oosit arasında ince bir hücresel ilişki söz konusudur. En iç katmanı oluşturan corana radiata hücreleri, zona pellusida üzerinden sitoplazmaya penetre olan uzantılar göndermekte ve bu gap junctionlar sayesinde oosit membranı ile ilişki halindedirler. Böylece kumulus hücreleri oosite metabolitleri transfer edebilmekte ve oosit aktivasyonunun düzenlenmesinde rol oynayabilmektedir (Sirard ve Blondin, 1996; Soom ve Kruif, 1996).

Oositler follikül içinde Mayoz I aşamasında, atreziye uğrayana veya LH dalgası gerçekleşene kadar beklemektedir. Luteinleştirici hormon dalgasından sonra dominant follikül içerisindeki oosit mayozu tekrar başlatır. Ancak bu olayların mekanizması hala açık değildir. Üzerinde durulan iki mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan biri, granuloza hücreleri arasındaki gap junctionların sayısının azaltılarak mayozun tekrar başlamasını engelleyen mayoz inhibitörlerinin etkisizleştirilmesi, diğeri ise folliküler sıvı elemanları ile mayoz uyarıcılarının yeniden düzenlenmesidir (Romero ve Seidel, 1996).

Follikül, cAMP (Siklik Adenozin Monofosfat), hipoksantin, guanozin ve adenozin gibi bir çok mayotik aktiviteyi durduran faktörler içermektedir (Soom ve Kruif, 1996). Bu faktörlerden hipoksantin, aynı reseptörlere bağlanan mitojenik lektinlerle ve TGF α ile uyarıldığı, insülin ve fibroblast büyüme faktörü ile de baskılandığı tespit edilmiştir (Romero ve Seidel, 1996). Diğer taraftan Thibault ve ark. (1987), folliküler hücrelerin mayozu durdurduğunu açıklamışlardır.

Luteinleştirici hormon dalgası, dominant follikülde bulunan ve bütünüyle gelişmiş oositin birinci mayoz bölünmesini tamamlamasını sağlar. Birinci mayoz bölünme germinal vezikülün parçalanması (GVBD), kromozomların yoğunlaşması ve ayrılması ile tamamlanmaktadır. Metafaz II (M II) döneminde, kromozomların bir grubu atılan birinci kutup cisimciğinin içerisinde yer alırken diğeri oosit II'de kalmaktadır. Bu dönemde oosit tekrar durağan hal almaktadır. Oosit, LH reseptörlerine sahip olmadığı için maturasyonun uyarılması muhtemelen kumulus hücreleri aracılığıyla olmaktadır (Soom ve Kruif, 1996).

Sığırlar, her östrus siklusu sonunda bir oosit ovulasyonu gerçekleştiren monoovülatör türlerdendir. Ovulasyon, yangısel reaksiyonla karşılaştırılabilir bir olaydır. Bunun sebebi ise gonadotropik uyarım sırasında teka ve granuloza hücrelerinde yangısel olaylara benzer değişikliklerin olmasıdır. Luteinleştirici hormon dalgasından yaklaşık 24 saat sonra follikül ruptüre olarak oosit açığa çıkmaktadır ve bölgede kapasite olmuş spermatozoaların bulunması halinde, oosit fertilize olmaktadır (Soom ve Kruif, 1996).

Folliküler oositler I. mayozun profaz (diploten) aşamasında beklemektedirler. Maturasyon, preovulatör LH dalgasından sonra follikülün son gelişimi ile birlikte olmaktadır (Bevers ve ark., 1997). Maturasyon; nükleer ve sitoplazmik maturasyon olmak üzere iki kısmı içermektedir (Bevers ve ark., 1997; Şeviktürk, 1998).

1.2.1. Nükleer Maturasyon

Fertilizasyondan önce oositin gelişmesi iki kez duraklar. Birincisi, yukarıda da bahsedildiği üzere I. mayoz bölünmenin profaz döneminde (germinal vezikül aşamasında) olur. Bu duraklama LH etkisiyle ortadan kaldırılarak, ikinci duraklama dönemine kadar gelişme sürdürülür. İkinci duraklama, II. mayozun

metafaz döneminde gerçekleşir ve böylece oosit maturasyonunu tamamlar. İkinci mayozda duraklamış olan oosit, spermatozoa penetrasyonu ile tekrar aktive edilerek II. mayozu kaldığı yerden tamamlar (Anderson, 1991; Niemann ve Meinecke, 1993; Gordon, 1994; Bevers ve ark., 1997; Bağış ve Sağırkaya, 2001). Nükleer maturasyon, mayozun yeniden başlaması ile germinal vezikül (GV) aşamasından M II plağının şekillenmesini kapsamaktadır (Thibault ve ark., 1987; Bevers ve ark., 1997).

Profaz I'in diploten aşamasındaki oosit morfolojik olarak; prominent (kabarcıklı) nükleus, belirgin nükleolus ve yaygın dağılmış olan kromatinle karakterizedir. Oositin büyük, kabarcıklı çekirdeği bu dönemde germinal vezikül adını alır (Niemann ve Meinecke, 1993). Nükleer maturasyonda gerçekleşen ilk basamak GVBD veya GV çözülmesi olarak adlandırılan olaydır. Bu aşama, kültürün ilk birkaç dakikasında GV'deki hafif dalgalanma ile başlamaktadır. Dalgalanma kültürün daha sonraki 1-2 saatlik döneminde artarak devam etmektedir. Bu dalgalanmanın sebebi ise kromozom yoğunlaşmasına bağlanmaktadır. Kültürün 1. saatinde nükleer gözenekler kaybolur ve 2. saatinde GV üzerinde yırtıklar görülmeye başlar. Kültürün başlamasından ortalama 3 saat sonra çekirdek zarı tamamen çözülür ve dağılır. Çözülen zar, daha sonraki pronükleer ve nükleer zar oluşumunda görev almak üzere endoplazmik retikulum havuzuna katılır (Wassarman, 1988).

Bivalent kromozomlar; arada profaz II aşaması bulunmadan metafaz I (M I), anafaz I ve telofaz I aşamalarını geçirerek M II dönemine ulaşırlar. Germinal veziküldeki dalgalanma ile birlikte, diffuz yapıda bulunan kromozomların yoğunlaşması başlar ve nükleer zarın iç kısmına toplanırlar. Bu dönemde kromozomlardaki çarpazlaşma (chiasmata) hareketi son bulur. Kromatinler heterokromatik hale gelirler ve kromozom yoğunlaşması ilerledikçe içerdikleri koyu granüller artmaktadır. Kültürün başlamasından ortalama olarak 2-3 saat sonra kromozom yoğunlaşması tamamlanmaktadır. Bivalent olan kromozomlar "V" şeklinde, telosentrik olarak yerleşirler ve

genellikle nükleer zar fragmenleriyle birleşik durumdadırlar. Bu aşamadan kısa bir süre sonra yüksek düzeyde yoğunlaşmış olan kromozomlar, oositin merkezinde dairesel biçimde dizilirler. Bu sırada nükleer zar fragmenleriyle olan ilişkilerini kaybederler. Kromozomlar, kültür başlangıcından 6-9 saat sonra ekvator da dizilir ve bu şekilde M I dönemi tamamlanır (Wassarman, 1988).

Anafaz I döneminde, bivalent olan kromozomlar birbirlerinden ayrılarak dizildikleri eksenin ters tarafına doğru kayarlar ve eksen mikroflamentleri tarafından 90° döndürülürler. Oositler, anafaz I aşamasına kültürün 10-13. saatlerinde ulaşmaktadırlar. Telofaz I döneminde, I. kutup cisimciğinin oositten ayrılması başlamaktadır. Kutup cisimciğinin içerisinde kromozomların yarısının yanı sıra mitokondria, ribozomlar ve kortikal granüller gibi organeller de yer almaktadır. Ancak telofaz I'in son dönemlerine doğru kromozomlarda dejenerasyon başlamaktadır. Metafaz II döneminde ise I. kutup cisimciği perivitellin boşluğa atılır ve kromozomlar tekrar ekvatorial olarak dizilirler (Wassarman, 1988).

1.2.2. Sitoplazmik Maturasyon

Sitoplazmik maturasyon;

- Mitokondriyonların, endoplazmik retikuluma yaklaşmak için periferal durumlarından taşınmaları,
- Lipit damlacıklarının ve veziküllerinin küçülmeleri ve sayıca azalmaları, daha sonra da merkezden perifere doğru yönelmeleri,
- Kortikal granüllerin subplasmalemma bölgesine doğru mobilize olmaları şeklinde maddelendirilebilir (Shamsuddin ve ark., 1993). Ancak maturasyon için mitokondrial organizasyonu ve enerji kaynaklarını anlamak önem arz etmektedir.

1.2.2.1. Mitokondrial Organizasyon ve Aktivitesi

Sığır oositlerindeki sitoplazmik maturasyon, proteinlerin sentezini ve fosforilasyonunu içeren bir çok moleküler olayları kapsamaktadır. Bu moleküler olaylar, mayozun tekrar başlamasında ve pronükleus oluşumunda da etkili olmaktadır. Sitoplazmik maturasyon; moleküler olaylara ek olarak gelişimi ve uygun metabolik döngünün kullanılmasını da içermektedir. Bu nedenle, somatik hücrelerde metabolik makine olan mitokondriyonlar kritik rol oynamaktadır. Mitokondriyonlar çeşitli sitoplazmik dağılımlarıyla, hücre proliferasyonu, differasyonu ve metabolik modifikasyon gibi hücre fonksiyonlarına katılmaktadır. Sığır oositlerinde, endoplazmik retikulum ile mitokondriyer arasında yakınlaşmanın olduğu ve bu iki yapının lipit damlacıklarıyla da ilişki kurdukları belirlenmiştir. Oosit nükleer maturasyona başladığı zaman lipit depolarından da yararlanmaya başlamaktadır ve sitoplazmik mikro çevrede metabolik açıdan bir değişiklik olmaktadır. Luteinleştirici hormon dalgasından önce mitokondrial dağılımın periferde yoğunlaşması ve nükleer maturasyonun son aşamalarında kortikal salkım oluşumu görülmektedir. Luteinleştirici hormon dalgasından yaklaşık 19 saat sonra, birinci kutup cisimciğinin atılması sırasında mitokondriyonların dağıldığı görülmektedir. Süperovüle edilen ineklerde; LH pikinden 15 saat sonra, maturasyonun başında oositlerde periferal mitokondrial salkım ve bu salkımların sitoplazmada dağılımları görülebilmektedir. İn vitro maturasyon denemelerinde, mitokondriyonların periferal durumlarından taşınmaları ve dağılımları kültürün 12-18. saatleri arasında gerçekleştiği bildirilmiştir (Krisher ve Bavister, 1998).

Sığır embriyolarındaki mitokondrial dejenerasyon kültür şartlarına bağlanmaktadır. Embriyolarda görülen gelişim farklılıkları bu kültür şartlarının mitokondrial aktiviteyi ve dağılımı etkilemesiyle oluşmaktadır. Mitokondrial fonksiyonların büyük kısmı maturasyon sırasında oluşmakta ve böylece embriyonik gelişimi de etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada, IVM için uygun ve eksik şartlar oluşturularak mitokondriyer incelenmiştir. Çalışma sonucunda;

iyi şartların uygulandığı grupta mitokondrilerin sitoplazma korteksinde yoğunlaştığı, yetersiz şartların uygulandığı oositlerin mitokondriyonlarının ise sitoplazma içerisinde homojen dağıldığı belirlenmiştir (Krisher ve Bavister, 1998).

1.2.2.2. Enerji Kaynakları ve Metabolik Döngü

İn vitro maturasyonda LH kullanılması, glikolitik aktiviteyi ve mitokondriyonların glikoz ve glutamin oksidasyonunu artırmıştır. Maturasyon sürecinde glikolizis ve pentoz fosfat döngüsünün aktivitesi düşük düzeyde seyretmesine rağmen GVBD'den sonra pürivatın, maturasyonun sonuna doğru da glutaminin oksidatif metabolizması hızlanmaktadır. Germinal vezikül parçalanmasından sonraki dönemde pürivat oksidasyonu, glikoz oksidasyonundan fazla olmaktadır. Bunlara ek olarak pürivat, glutamin ve glisin oksidasyonu sığır oositlerinin en önemli enerji üretim yollarıdır (Gordon, 1994; Krisher ve Bavister, 1998).

Glikolizis aktivitesinin azalması, oositlerin gelişim yeteneğini kazanmasında kritik rol oynayan pentoz fosfat döngüsünün azalmasına neden olmaktadır. Farelerde, pentoz fosfat döngüsü ile glikoz kullanımı fosforibozil pirofosfat üzerinden mayozu uyarmaktadır. Farelerde ve sığırlarda mayozu durduran ve tekrar başlatan benzer mekanizmaların varlığı bilinmemesine rağmen, sığır oositlerinde pentoz fosfat döngüsünün aynı etkiyi yaratabileceği düşünülmektedir (Krisher ve Bavister, 1998).

1.3. Oosit Kaynakları

Kumulus oosit kompleksleri, hem mezbahadan toplanan ovaryumlardan hem de canlı hayvanlardan aspirasyon yöntemi ile elde edilebilmektedir (Greve ve ark., 1993).

1.3.1. Canlı Hayvanlardan Oosit Toplanması

Canlı hayvanlardan in vitro fertilizasyon için oositlerin eldesinde laparoskopi, transvaginal ultrasonografi rehberliğinde follikül aspirasyonu, laparotomi ve ovariektomi gibi değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında en çok tercih edilenleri laparoskopi ve transvaginal ultrasonografi rehberliğinde follikül aspirasyonudur (Callesen ve ark., 1987).

1.3.1.1. Transvaginal Ultrasonografi Rehberliğinde Follikül Aspirasyonu

In vitro fertilizasyon çalışmalarında kullanılan oositlerin canlı hayvanlardan toplanması amacıyla önceleri süperovulasyon denenmiştir. Ultrasonografinin hızlı bir şekilde gelişmesiyle hem abdominal hem de transvaginal yoldan aspirasyon yapılabilmektedir (Greve ve ark., 1993). Transvaginal ultrasonografi rehberliğinde follikül aspirasyonu ilk olarak insanlarda uygulanmış, daha sonra sığırlarda ve kısıraklarda kullanım şansı bulmuştur. Ayrıca östrus siklusunun değişik dönemlerinde ve gebe ineklerde, güvenli ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Meintjes ve ark., 1993; Ooe ve ark., 1997).

Teknikte; sedasyon ve intestinal sistemde gevşeme amaçlı 0.1 ml/100 kg canlı ağırlık dozunda Domosedan® (Detomidine hydrochloride 10 mg/ml, Smith Kline Animal Health Ltd.) intravenöz olarak uygulanmaktadır. Yine intestinal sistemdeki gevşemeyi desteklemek için Buscopan® 1 ml/100 kg dozunda (Hyoscine-N-butylbromide 4 mg/ml, Boeringer Ingelheim) kullanılmaktadır. Abdominal ıkınma olmaması amacıyla da üst epidural anestezi (5 ml %2'lik Lidocaine) yapılmaktadır. Teknikte, genellikle 5 MHz'lik problar tercih edilmekte ve prob ucunda iğne yer almaktadır (Pieterse ve ark., 1988). En uygun aspirasyon basıncı 18 G'luk iğnede 40 mmHg, 21 G'luk iğnede 80 mmHg olarak bildirilmektedir (Hashimoto ve ark., 1999).

Transvaginal olarak uygulanan prob serviksin yan tarafına doğru kaydırılır ve operatör diğer eliyle rektal yoldan ovaryumları probun baş kısmına getirir. Aspire edilecek follikül belirlendiğinde yardımcı tarafından probun ucundaki iğne aracılığıyla vaginal duvar geçilerek follikül delinmekte ve aspire edilmektedir. Follikül sıvısı tamamen alındıktan sonra iğnenin hafif döndürme hareketleriyle, folliküler duvarın küretajı yapılarak follikülden çıkılmaktadır (Pieterse ve ark., 1988).

Transvaginal ultrasonografi rehberliğinde follikül aspirasyonundan oosit elde etme oranı; hormon uygulaması, delme sıklığı, östrus siklusunun dönemi, aspirasyon basıncı, iğne çapı ve operatör deneyimi gibi bir çok faktörden etkilenmektedir (Pieterse ve ark., 1992; Bols ve ark., 1996).

Yapılan bir çalışmada, östrus siklusunun 3-4. günlerinde ortalama 5,1; 9-10. günlerinde 3,7 ve 15-16. günlerinde 4,3 adet ortalamayla follikül aspire edilmiştir. Altı ay boyunca her östrus siklusunda 3 kez uygulanan bu teknik bir sonraki siklusu olumsuz etkilememiştir (Greve ve ark., 1993). Benzer şekilde Pieterse ve ark. (1988) sikluslarda düzensizlik ve travmatik lezyonlara rastlamamışlardır. Schans ve ark. (1991), transvaginal ultrasonografi rehberliğinde follikül aspirasyonu sıklığının, aspire edilen follikül sayısını ve toplanan oosit sayısını etkilemediğini bildirmişlerdir.

1.3.1.2. Laparoskopi Aracılığıyla Follikül Aspirasyonu

Teknikte; üst epidural anestezi uygulandıktan sonra perineal bölge antiseptik solüsyonlarla temizlenir ve vagina 1:10 oranında sulandırılmış iyot solüsyonu ile yıkanır. İyot solüsyonundan sonra vagina serum fizyolojik ile 4 kez durulanır. Bu işlemleri takiben portio vaginalis serviksin üstünden vaginal duvara ve peritona 8 cm büyüklüğünde bir ensizyon hattı açılır ve ensizyon hattının dilatasyonunu sağlamak amacıyla parmaklar pelvik boşluğa sokulur. Elin geri çekilmesinden sonra laparoskopla birlikte tekrar sokulur. Aspiratör

takılı olan laparoskopun kamerasına her bir ovaryum ayrı ayrı getirilir ve monitörden incelenir. Daha sonra operatör monitöre bakarak aspiratörün ucunu folliküle yönlendirir ve aspirasyon işlemini gerçekleştirir. Follikül aspiratörünün çapına bağlı olmakla birlikte 2-6 mm'lik folliküller aspire edilebilmektedir. Aspire edilen follikül 1 ml vasatla saat yönünde ve tersi yönünde bir çok kereler yıkanır. Bu işlemler her iki ovaryumdaki folliküller bitene kadar her follikül için tekrarlanmaktadır. Vasat olarak içinde 40 IU heparin sodyum, %10 serum, 25 mM/l Hepes (N-(2 hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2 ethanesulphonicacid)) bulunan F-10 vasatı kullanılmaktadır (Stubbing ve ark., 1990).

1.3.2. Mezbahadan Getirilen Ovaryumlardan Oosit Toplanması

Günümüzde en yaygın oosit kaynağı, mezbahalardan toplanan ovaryumlardır. Ovaryumların üzerinde bulunan oositler maturasyon, fertilizasyon ve blastosist oluşturma oranlarında azalma olmaksızın 8 saat süreyle 25 °C'de saklanabilmektedir. Bunun yanında 37 °C ve 4 °C'de yaşama kabiliyetleri azalmaktadır (Greve ve ark., 1993; Sirard ve Blondin, 1996).

Araştırmacılar arasında, ovaryumların en geç kesimden sonraki 1-2 saat içerisinde alınması ve yaklaşık 30 °C'de saklanması gerektiği yaygın bir kanıdır. Ovaryumların taşıma sıcaklığı 30 °C'nin altına düştüğünde, oositlerin nükleer maturasyonu tamamlayamadıkları, diğer taraftan 30-37 °C'de ovaryumlarda meydana gelecek olan dejeneratif değişikliklerin, daha düşük sıcaklığa (20-25 °C) indirilmesinde meydana gelecek olan değişikliklerden daha ciddi olduğu bulunmuştur (Gordon 1994).

Sirard ve Blondin (1996), mayotik gelişim 2 saat içerisinde başlatılmazsa, oositlerin RNA üretim kapasitelerini kaybettiklerini belirlemişlerdir.

Kesimden sonra alınacak ovaryumların, mümkün olduğu kadar çevre dokulardan ayrı şekilde alınması gereklidir. Transport vasatı olarak fosfatlı tampon solüsyonu (PBS) ve antibiyotikli (penisilin, streptomisin, kanamisin, amphoteresin-B) %0,9 NaCl kullanılmaktadır (Greve ve ark., 1993).

1.3.2.1. Follikül Aspirasyonu

Mezbaha materyallerinden follikül aspirasyonu son zamanlarda kullanılan en yaygın uygulamadır. Ancak aynı ovaryum üzerinde tekrarlanması mümkün olmayan bir tekniktir. Teknikte, aspirasyon cihazı ya da iğneli enjektör kullanılmaktadır. Aspirasyon basıncı 50-130 mmHg arasında tercih edilmekte ve genellikle 18-21 G'luk iğneler seçilmektedir (Pieterse ve ark., 1991).

İyi kalitede kumulus oosit komplekslerinin toplanmasında, iğne çapı ile aspirasyon basıncı arasındaki ilişki önemlidir (Bols ve ark., 1996). Bols ve ark. (1996), aspirasyon basıncı ve iğne çapının sığır oosit morfolojisi ve gelişim kapasitesi üzerine etkisini çalışmışlardır. Kullandıkları 18,19 ve 21 G'luk iğnelerde beş değişik seviyede (50,70,90,110,130 mmHg) aspirasyon basıncı denemişlerdir. En yüksek sayıda oosit eldesini en kalın (18 G) iğne kullanımıyla ve en yüksek aspirasyon basıncıyla elde etmişlerdir. Aspirasyon basıncının derece derece artmasıyla oositleri saran kompakt kumulus hücrelerinde azalma olmuştur. Follikül aspirasyon basıncı 70-130 mmHg arasında arttıkça in vitro maturasyon, fertilizasyon ve blastosiste ulaşma başarısının düştüğü gözlenmiştir.

Hashimoto ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada kumulus hücreleri 4 ve daha fazla katlı olanlar 18 G'luk iğnelerle 40 mmHg basınç altında, kumulus hücreleri 1-3 katlı olan oositler ise 21 G'luk iğnelerle 120 mmHg basınç altında çok miktarda elde edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada (Fry ve ark., 1997) ise hem in vitro maturasyon için yaşayabilir oositlerin eldesinde hem de her kalitedeki oosit eldesinde 17 G'luk iğnenin 20 G'luk iğneden oldukça başarılı olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, aspirasyonda kullanılan iğnenin iç çapı 0.6 mm'den 0.7 mm'ye çıkarıldığı zaman oosit elde etme oranı %42'den %58'e yükselmiştir. Oosit elde etme oranı 200 mmHg'lık aspirasyon basıncında 120 mmHg ve 180 mmHg'ye göre daha yüksek bulunmuştur.

1.3.2.2. Follikül Diseksiyonu

Sağlam veziküler folliküllerin (2-8 mm çaplı) diseksiyonu, koyunlarda önemli bir teknik olarak kullanılmaktadır. Bu metotla kumulus hücrelerinde en az parçalanmaya neden olunmasından dolayı yüksek oranda morfolojik olarak onaylanabilir oosit toplanabilmektedir. Oosit elde etme tekniği olarak kullanılan follikül diseksiyonunun avantajı, non-atretik folliküllerin tahmin edilebilmesidir. Non-atretik olanlar uniform yarı saydam görünüşlü, yaygın vaskularizasyonlu ve follikül içinde düzenli stratum granulosum tabakasına sahip folliküllerdir. Diğer yandan atretik folliküllerde; donuk, gri, opak görünüş ve yaygın olmayan vaskularizasyon bulunmaktadır (Gordon 1994).

1.3.2.3. Ovaryum Dilimleme Tekniği

Ovaryum dilimleme tekniği hem direkt olarak hem de follikül aspirasyonundan sonra uygulanabilmektedir. Bu teknik ilk kez sığır ovaryumlarında denenmiştir. Bahsedilen çalışma sonucu ovaryum başına ortalama 20-30 adet oosit elde edilmiştir. Günümüzde ovaryum dilimleme tekniği koyunlarda da kullanım alanı bulmaktadır (Gordon, 1994).

Ovaryum dilimleme tekniği ile oosit elde etmede en çok kullanılan vasatlar; doku kültürü vasatı 199 (TCM 199) ve PBS'dir. Ancak Gordon

(1994), bu tekniğin kullanımında TCM 199'un PBS'e oranla daha başarılı sonuçlar verdiğini bildirmekte ve bu durumu PBS içerisinde bulunan yüksek konsantrasyonlardaki Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarına bağlamaktadır.

1.3.2.4. Doku Eritme Tekniği

Bu tekniğe göre; ovaryum dokusu 1 saat boyunca tripsine tabi tutularak elde edilen ekstrakt 200 μm 'lik filtreden geçirilir. İmmatür oositlerin ortalama çaplarının 100 μm olması dūřuncesine dayanan bu filtrasyon tekniği ile ovaryum başına ortalama 221 oosit toplanmıştır (Gordon, 1994).

1.3.2.5. İn Vitro Follikül Kūltürü

Çiftlik hayvanlarında, ovaryumlardaki fibröz (matrix) dokudan dolayı preantral folliküllerin izolasyonu oldukça zor olmaktadır. Bu nedenle önce ovaryumlar doku dilimleyicisi (chopper) ile kūuk parçalara ayrılmakta ve daha sonra ise tekrarlayan pipetasyonlarla folliküllerin izolasyonu mekanik olarak sađlanmaktadır. Bu mekanik yontemle primer ve sekonder folliküller (40-70 μm) izole edilebilmektedir (Hurk ve ark., 1997). Kollegenaz uygulaması ile mekanik izolasyon yonteminin kombinasyonundan, mekanik yontemin yalnız kullanımına göre daha fazla follikül elde edilebilmektedir (Hurk ve ark., 1997; Cortvrindt ve Smitz, 2001). Ancak enzimin zarar verici etkisinden kaçınmak için çok tercih edilmemektedir. Benzer řekilde ftal buzađı ovaryumlarından mikrodisseksiyon ile folliküller toplanabilmektedir. Yine, bu yontemle būyuk preantral folliküller (170-180 μm) de izole edilebilmektedir (Hurk ve ark., 1997). İn vitro follikül kūltür sūresi, kūltüre edilen folliküllerin çaplarına göre (150-170 μm /4-5 gūn, 100-130 μm /12 gūn) deđiřmektedir (Cortvrindt ve Smitz, 2001).

İneklerde; erken dönemdeki preantral folliküllerin, üç boyutlu kollagen doku kültürlerinde inkubasyonlarıyla iyi sonuçlar elde edilmektedir. Granulosa hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması sayesinde küçük preantral folliküller (30-70 μm) 7 günlük inkubasyonda en fazla 20 μm büyüyebilmektedir. Büyük preantral folliküller (170 μm) ise hem granulosa hücrelerinin proliferasyonu hem de oosit gelişimi sayesinde (60 μm 'den 67 μm 'ye) 5 günlük inkubasyonla ortalama 55 μm büyüyebilmektedir (Hurk ve ark., 1997).

In vitro kültüre edilen preantral folliküllerin canlı kalabilmesinde ve gelişebilmesinde FSH, EGF, TGF β , bFGF, aktivin ve VIP'lerin çok önemli olduğu tespit edilmiştir (Hurk ve ark., 1997). Cortvrindt ve Smitz (2001), fetal ovarium dokusundan elde ettikleri primordial follikülleri serum eklemeden, sekonder aşamaya getirebildiklerini bildirmişlerdir.

1.4. In Vitro Maturasyonu Etkileyen Faktörler

Bir oositin gelişim yeteneğine sahip olması; mayotik programı yeniden başlatması ve tamamlaması, fertilizasyonu başarabilmesi ve embriyonik gelişimi sağlayabilmesi şeklinde açıklanmaktadır (Gliedt ve ark., 1996b). Bu gelişim yeteneğine; kumulus morfolojisi, follikül büyüklüğü, follikül sağlığı, ovarium stimülasyonu ve kültür öncesi manüplasyonlar olmak üzere 5 ana faktör etkili olabilmektedir (Sirard ve Blondin, 1996).

In vitro maturasyonun başarısını oositin alındığı hayvanın vücut kondüsyonundan, vasat katkı maddelerine kadar bir çok faktör etkilemektedir. In vitro embriyo üretim laboratuvarlarında elde edilen sonuçların oldukça dalgalı olması bu nedenlere bağlanmaktadır (Soom ve Kruif, 1996).

1.4.1. Yaş

İn vitro fertilizasyon çalışmalarında oosit eldesi için verici olarak kullanılacak hayvanların yaş aralığı oldukça geniştir. Oositler, bir aylık buzağılardan bile alınabilmektedir. Bu oositler in vitro fertilizasyon için uygun bulunmuş, ancak blastosist oranları yetişkin hayvanlardan alınan oositlerden oldukça düşük tespit edilmiştir. Prepubertal hayvanlarla, üç yaşın altındaki inekler yaşlı hayvanlara göre oldukça fazla oosit gelişim kapasitesi göstermişlerdir (Soom ve Kruif, 1996).

Genç olan verici hayvanların oositlerinin gelişim yeteneklerinde daha fazla bozulma olmaktadır. Ekzojen gonadotropin uygulamaları ile bu hayvanların oositlerinde, erken embriyonik bölünme oranlarında olumlu gelişmeler olmuş ancak blastosist oranları artmamıştır (Yang ve ark., 1998).

1.4.2. Follikül ve Oosit Çapı

İn vitro maturasyonun ve embriyo üretiminin başarısı follikül kaynağı ve oosit büyüklüğü ile yakından ilişkilidir (Arlotto ve ark., 1996; Yang ve ark., 1998). Bir-15 mm'lik follikül çaplarını içeren çalışmalarda sığır oositleri gelişimlerine devam etmektedir (Arlotto ve ark., 1996). Oositlerin normal embriyonik gelişim yeteneklerini kazanabilmeleri için folliküllerin en az 2 mm çapa ulaşmaları gerekmektedir (Yang ve ark., 1998). Soom ve Kruif (1996) 6 mm'den, Sirard ve Blondin (1996) 8 mm'den büyük folliküllerden sağlanan oositleri daha küçük folliküllerden sağlanan oositlere göre daha başarılı bulmuşlardır.

Oositler, yüzeysel görülebilir (periferal) folliküllerden ve kortikal folliküllerden toplanmaktadır. Hem periferal hem de kortikal oositlerin toplanması ile bir ovaryumdan alınan oosit sayısı yaklaşık iki katına çıkmaktadır. Kortikal folliküllerden alınan oositler yüzeysel olanlardan daha

küçüktür ve bu oositlerin mayotik maturasyon kapasiteleri ile embriyo gelişim kapasiteleri düşüktür. Kortikal oositlerden yalnızca büyük olanlar IVM'yi gerçekleştirebilmişler ve blastosiste gelişim oranları periferal oositlerle karşılaştırılabilir bulunmuştur (Arlotto ve ark., 1996). Büyüklükleri 110 μm 'den küçük olan oositler mayotik olarak ve gelişim kapasitesi bakımından henüz yeterli değildir (Soom ve Kruijff, 1996, Yang ve ark., 1998). Sitoplazmik farklılıklardan dolayı büyük oositler küçüklere göre biraz daha hızlı bir şekilde birinci kutup cisimciğini atmaktadır. Birinci kutup cisimciğini erken atan oositlerde embriyonik gelişim oranı daha fazla görülmektedir (Arlotto ve ark., 1996). Küçük oositler gelişimlerini tamamlayamamakta ve bu nedenle yeterli miktarda RNA sentezleyememektedir (Greve ve Madison, 1991).

Bir memeli oositi maturasyon yeteneğini kazanabilmesi için gelişim evresini, kritik büyüklüğünden önce tamamlamalıdır. Farelerde, oositteki bu gelişim evresi preantral dönemde başlamakta ve folliküller antrum evresine ulaştıkları zaman bitmektedir. Sığırlarda, antral follikül gelişimi esnasında da oositin büyüklüğü artmaktadır. Tam olarak mayotik yeteneği kazanmak için, yukarıda da belirtildiği gibi oositin kritik çap olan 110 μm 'ye ulaşması gerekmektedir (Yang ve ark., 1998). Başka bir araştırmacı, oositler büyüklüklerinin %80'lik bölümüne geldiklerinde mayotik yeteneğin görüleceğini bildirmiştir (Şeviktürk, 1998). Ancak, pratikte bir çok laboratuvar 1-8 mm çaplı folliküllerden topladıkları oositlerin rutin embriyo üretiminde kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Yang ve ark., 1998).

Follikül büyüklüklerinin oosit gelişimleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; büyük folliküllerden (5-8 mm) alınan oositlerle orta büyüklükteki (2-5 mm) folliküllerden alınan oositler arasında maturasyon oranı, erken embriyonik bölünme oranı ve blastosist oranları açısından fark bulunmamıştır. Ancak, küçük folliküllerden (1-2 mm) alınan oositlerin tüm bu oranları oldukça düşük çıkmıştır (Çizelge 1.1). Bunun yanında 1-2 mm çaplı folliküllerdeki oositlerin %26 oranında blastosist oluşturabilmeleri nedeniyle daha küçük folliküllerde de denemeler yapılmıştır (Çizelge 1.2). Ancak, çok

küçük folliküllerden (0,5-1 mm) alınan oositlerin başarı oranları oldukça düşük bulunmuştur (Yang ve ark., 1998). Diğer taraftan Leibfried ve ark. (1985), 1-3 mm çapındaki ve 3-20 mm çapındaki folliküllerde yaptıkları çalışmada oositlerin maturasyon kabiliyetleri arasında fark bulamamışlardır. Yapılan başka bir çalışmada (Küplülü ve Ün, 2001) ise 3-6 mm ve 6-20 mm çapındaki folliküllerin maturasyon oranları birbirlerine benzer (%76 ve %74), 1-3 mm'lik folliküllerden (%61) üstün bulunmuştur.

Çizelge 1.1. Küçük, orta ve büyük folliküllerden alınan oositlerin gelişim yetenekleri (Yang ve ark., 1998).

Fol. Çapı (mm)	Maturasyon		Embriyo Gelişimi/Oosit		
	Toplam	Matür (%)	Toplam	Erk. Embr. Bölünme (%)	Blastosist (%)
1-2	147	85 (58)	117	80 (68)	30 (26)
2-5	161	121 (75)	122	103 (84)	56 (46)
5-8	105	88 (84)	77	59 (77)	40 (52)

Çizelge 1.2. Orta ve çok küçük folliküllerden alınan oositlerin gelişim yetenekleri (Yang ve ark., 1998).

Fol. Çapı (mm)	Maturasyon		Embriyo Gelişimi/Oosit		
	Toplam	Matür (%)	Toplam	Erk. Embr. Bölünme (%)	Blastosist (%)
0.5-1	236	63 (27)	64	20 (31)	7 (11)
2-5	260	210 (81)	84	65 (77)	43 (51)

1.4.3. Oosit Kalitesi

In vitro embriyo üretim protokolünde yüksek düzeyde başarı sağlamak için gelişim yeteneğine sahip kumulus oosit kompleksleri ile yetersiz gelişim yeteneğine sahip olanları ayırt etmek gerekmektedir. Kısmi veya total kumulus hücre kayıplarının gelişim yeteneğini azalttığı ve çok katlı kumulus hücre katmanı bulunan iyi görünümlü kumulus oosit komplekslerinin de yüksek düzeyde gelişim kapasitesi gösteremeyebilecekleri bildirilmiştir. Bununla birlikte, gelişim yeteneğine sahip kumulus oosit komplekslerinin karakteristik özellikleri halen bilinmemektedir (Wit ve ark., 2000). Diğer taraftan bazı araştırmacılar, oosit görüntüsü ve kumulus hücrelerinin, gelişme potansiyeli tahmininde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Maturasyon, fertilizasyon ve blastosist aşamasına gelebilme kabiliyeti olabilmesi için

oositin çevresi çok katlı, sıkışık kumulus hücreleriyle tamamiyle kuşatılmış ve sitoplazmasının bir örnek kumlu görünümlü olması gerektiği tespit edilmiştir. Oositin çevresindeki sağlıklı somatik hücre popülasyonunun besin geçişinin kolaylaştırılmasında ve oosite gelen uyarımların iletilmesinde zorunlu olduğu kaydedilmiştir (Leibfried ve ark., 1985; Greve ve Madison, 1991; Greve ve ark., 1993; Sirard ve Blondin, 1996).

Kumulus hücrelerinin maturasyona etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, çıplaklaştırılan oositlerde ya maturasyon gerçekleşmemiştir ya da düşük düzeyde saptanmıştır. Kumulus hücreleri ile kaplı oositlerin, çıplak veya korona hücreleriyle kaplı olan oositlere göre in vitro maturasyon oranları oldukça yüksek bulunmuştur (Younis ve ark., 1989).

Kumulus hücrelerinin fonksiyonu, oosite çevresi arasındaki ilişkiyi sağlamaktır. Oosit maturasyonu için anahtar bir faktör olan LH, düzenleyici rolünü kumulus hücrelerini etkileyerek yapmaktadır. Benzer şekilde mayotik maturasyon ve kumulus ekspansiyonunda görev yapan EGF'nin olumlu etkisi kumulus hücrelerinin varlığında ortaya çıkmaktadır (Soom ve Kruif, 1996).

Yapılan bir çalışmada, follikül kalitesi ile KOK'lar arasında yakın bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Buna göre, düşük düzeyde atreziye uğramış folliküllerden yüksek oranda iyi kalitede oosit toplandığı, folliküllerde atrezi arttıkça orta ve kötü kalitede oositlerin daha fazla toplandığı bildirilmiştir. Ancak adı geçen çalışmada en fazla gelişim yeteneği orta kalite oositlerde sağlanmıştır (Wit ve ark., 2000).

1.4.4. Oosit Toplama Tekniği

Oosit toplama tekniği olarak transvaginal ultrasonografi rehberliğinde folliküllerin aspire edilmesi; in vitro maturasyon kapasitesine sahip oositlerin bulunabileceği folliküllerin belirlenmesinde avantaj oluşturmaktadır. Ayrıca,

maksimum sayıda folliküllerin bulunduğu siklus dönemi de belirlenebilmektedir. Regresyona ve atreziye doğru giden folliküller ayırd edilebilmektedir. Bu sayede IVM ve daha sonraki gelişim oranları yüksek seviyede olabilmektedir (Greve ve ark., 1993).

Hashimoto ve ark. (1999), canlı hayvanlardan ultrasonografi rehberliğinde follikül aspirasyonu ile mezbaha mataryellerinde yapılan follikül aspirasyonlarını karşılaştırmış ve sonuçta mezbahadan alınan ovaryumlarda follikül aspirasyonunun daha uygun olduğunu bildirmişlerdir. Transvaginal ultrasonografi ile follikül aspirasyonundan toplanan oositlerin kumulus hücreleri, mezbahadan alınan ovaryumların folliküllerinin enjektör ile aspirasyonunda elde edilenlerden daha az katmanlı bulunmuştur. Az sayıda kumulus hücresi tabakası olan bu oositlerin, aynı şekilde IVM oranlarının ve sonraki gelişim yeteneklerinin zayıf olduğu bildirilmiştir. Ancak çevresi korona hücreleriyle kaplı oositlerin IVM'sinde kumulus hücreleri eklenmesi başarı oranlarını artırmıştır. Bahsedilen artış çıplak oositlerde görülmemiştir.

1.4.5. Östrus Siklusu

Oositlerin, östrus siklusu dönemine göre sitoplazmasında ve kromatinlerinde değişiklikler olmasına rağmen maturasyon ve fertilizasyon oranlarında farklılık saptanmamıştır (Leibfried ve ark., 1985; Arlotto ve ark., 1996; Soom ve Kruif, 1996). Ayrıca yine gebe hayvanlarda oosit kalitesi açısından herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır (Soom ve Kruif, 1996). Yukarıdakilerin aksine Wit ve ark. (2000), in vitro embriyo üretiminde kullanılan oositlerin toplandığı folliküllerin, folliküler döneminin ve östrus siklusu döneminin sonuçları etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Bu durumun sebebini ise oositlerin maruz kaldıkları östradiol, progesteron, FSH ve LH'nın farklı seviyelerde olabilecekleri şeklinde açıklamışlardır.

Yukarıda da belirtildiği gibi mayotik durgunluğu kumulus hücreleri kontrol etmektedir. Zona pellusidaya penetre olmuş kumulus hücreleri bu etkilerini oositle ilişki kurdukları gap junction tipi bağlantılarla yapmaktadır. Durağan olan maturasyonun in vivo ve in vitro olarak tekrar başlaması kumulus hücreleri ile oositler arasında olan bağın çözülmesi ile olmaktadır. Sıkı ve homojen kumulus hücreleri ile kaplı oositlerde gap junctionların baskın olduğu, atretik folliküllerden alınan oositlerde ise gap junction bağlantılara rastlanmadığı bildirilmiştir. Bu bulgu ile atretik folliküllerde bulunan oositlerin maturasyona başladığı tespit edilmiştir. Ayrıca folliküllerdeki dejenerasyonla desmolaz ve aromataz aktivitenin düşmesi sonucu; östradiol 17 β ve testosteron seviyesi azalmakta, progesteron seviyesi artmaktadır. Hormon seviyesindeki değişiklikler LH dalgasından sonra ortaya çıkmaktadır ve bunun sonucu olarak immatür oositlerin gelişim yetenekleri etkilenmektedir (Wit ve ark., 2000).

Siklik olmayan hayvanlardan; folliküler ve erken-geç luteal evrede bulunan hayvanlara göre daha fazla kötü kalitede oosit toplanmıştır. Kötü kalitedeki oositlere, erken luteal dönemde daha az rastlanmıştır (Wit ve ark., 2000).

1.4.6. İn Vitro Maturasyon Vasatları

Ham'ın F-10, Ham'ın F-12, Brinsters BMOC-3, Waymouth'un MB 752/1, KRB (Krebs Medium) ve MEM (Minimum Essential Medium) in vitro maturasyon vasatları olarak kullanılmasına rağmen hangi vasatın daha baskın olduğuna dair fikir birliği oluşmamıştır (Greve ve Madison, 1991). Ancak TCM 199 (Greve ve Madison, 1991; Greve ve ark., 1993; Soom ve Kruif, 1996) ve TALP (Tyrode'nin Albumin Laktat Pürivat Vasatı) (Greve ve Madison, 1991) in vitro maturasyon/in vitro fertilizasyon çalışmaları için en çok seçilen vasatlar olarak bildirilmiştir. Doku kültürü vasatı 199, hücre kültürü vasatı olarak düzenlenmesine rağmen oosit maturasyonu için bir çok faktör

barındırmasından dolayı IVM çalışmalarında da kullanılmaktadır. Serumsuz maturasyon vasatlarına enerji kaynağı olarak glutamin ve glikoz ya da laktat eklenmesi ile TCM 199 vasatına benzer sonuçlar elde edilmektedir (Soom ve Kruif, 1996). Örnek olarak Ham'ın F-10 vasatına östrustaki inek serumu (ECS) ve granulosa hücrelerinin eklenmesi ile matüre edilen sığır oositlerinde, gebelik oluşturulabildiği bildirilmiştir (Trounson, 1992).

In vitro maturasyon vasatlarının kullanılmasında iki eğilim bulunmaktadır. Bunlardan biri kullanılan vasatta yer alan bütün elemanların tamamen bilinmesidir (defined) (Keskintepe ve Brackett, 1996). Diğeri ise vasatın, oositin orijinal çevresi preovülatör folliküle benzetilmeye çalışılmasıdır (non-defined). Sentetik sığır follikül sıvısı (BsFF), yeni kullanılan IVM vasatıdır. Temeli preovülatör follikül sıvısında bulunan iyon içeriğine dayanan bu vasatın serumsuz kullanımı, TCM 199'un serumsuz kullanımına göre başarısız bulunmuştur (Soom ve Kruif, 1996).

Gliedt ve ark. (1996a) tarafından TCM 199 ve RPMI-1640 vasatlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, kumulus ekspansiyonu RPMI-1640'da daha fazla gözlenmiştir. Ancak, 7. gündeki morula gelişimi TCM 199 vasatında matüre edilenlerde (%21,1), RPMI-1640'da matüre edilen (%9,6) oositlerden daha yüksek çıkmıştır.

Memeli oositlerinin in vitro maturasyonu sırasında kullanılan vasat, in vitro maturasyonu ve sonraki embriyolojik gelişimi etkilemektedir. Kimyasal olarak tanımlanmış bazı vasatlarda in vitro maturasyondan sonra karşılaştırma yapılmıştır. Buna göre Ham'ın F-12 ve Waymouth'un MB 752/1 vasatında fertilizasyon ve embriyonik gelişim TCM 199 ve MEM'e göre oldukça düşük bulunmuştur (Brackett ve Zuelke, 1993).

1.4.7. İn Vitro Maturasyonda Kullanılan Vasat Katkı Maddeleri

Oositlerin fertilizasyonu ile birlikte tam gelişim kapasitesinin olabilmesi için maturasyonun tatmin edici şekilde olması gerekmektedir. Eğer spesifik kültür şartları sağlanacak olursa sığır oositlerinin maturasyonunda başarılı olunacağına inanılmaktadır (Sanbuissho ve Threlfall, 1990).

1.4.7.1. Hormonlar

Memeli oositlerinin mayozu üzerine yapılan ilk çalışmalar, vasatlara hormon eklenmeden serumla birlikte spontan olarak mayozun tekrar başladığını göstermiştir. Bu şartlar altında kültüre edilen oositler sperm penetrasyonundan sonra normal pronükleus oluşturmada ya başarısız kalmışlar ya da alıcılara transferlerinden sonra embriyonik gelişme olmamıştır (Younis ve ark., 1989).

İyi dengelenmiş hormonal mikro çevre, oositle çevresi arasında iletişimi sağlamaktadır. Bu nedenle maturasyon esnasında iyi hazırlanmış hormonal çevre büyük önem taşımaktadır (Greve ve Madison, 1991). Bahsedilen durum göz önüne alındığında FSH, LH, östradiol-17 β ve hatta progesteron gibi hormonlar vasata eklenebilmektedir (Brackett ve ark., 1989; Greve ve Madison, 1991).

Steroidler

Memeli olmayan türlerde, mayozun tekrar başlaması progesteron veya bir progesteron derivatı tarafından gerçekleştirilmektedir. Memelilerde ise steroidlerin in vitro maturasyondaki rolleri hala açık değildir. İneklerde LH piki sırasında, teka hücrelerince androstenedionun üretimi inhibe edilmektedir ve mural granulosanın lüteinleşmesi uyarılmaktadır. Luteinleştirici hormon

pikinden 6 saat sonrasına kadar östradiol konsantrasyonu yüksektir ve yaklaşık 20 saat sonra progesteron artışını takiben östradiolde ani bir azalma meydana gelmektedir. Östradioldeki bu gerileme ile eş zamanlı olarak GVBD gerçekleşmesine rağmen östradiolün mayozu başlattığına dair bir kanıt bulunmamaktadır (Bevers ve ark., 1997).

Rat, domuz ve sığır folliküllerinin kültürü sırasında steroidlerin veya steroidogenezis inhibitörlerinin eklenmesi, oositlerdeki nükleer maturasyona etki göstermemiştir. Diğer taraftan progesteronun ve androstenedionun domuz oositlerinde olumsuz etkileri belirlenmiştir (Sirotkin, 1992). Fukui ve Ono (1989), steroidlerin özellikle de östrojenlerin memeli oositlerinin hem nükleer hem de sitoplazmik maturasyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Bevers ve ark. (1997), androstenedionun yalnız veya FSH ile birlikte kullanılmasının oositlerde GVBD görülme yüzdesini azalttığını bildirmişlerdir. Xu ve ark. (1986), östradiol benzoat ve hCG'nin (İnsan Koriyonik Gonadotropini) birlikte kullanımlarının maturasyon sonuçlarını desteklediğini bildirmişlerdir.

Tavşan ve sığır oositlerinin in vitro maturasyonunda progesteron kullanılması nükleer maturasyonu uyarmaktadır. Ancak bu etki domuzlarda ve insanlarda görülmemektedir. Östradiol-17 β ise sığır ve ratlarda nükleer maturasyonu uyarırken domuz oositlerinde durdurmaktadır. Koyun ve tavşan oositlerinin maturasyon vasatında östradiol bulunması fertilizasyon ve erken embriyonik bölünme kabiliyetini artırmaktadır. Sığır oositlerinde östradiolün kullanılması sitoplazmik maturasyonu etkilemezken, maturasyondan sonra kullanılması fertilizasyon ve erken embriyonik bölünme oranlarını artırmaktadır (Sirotkin, 1992). Gliedt ve ark. (1996a), sığır oositlerinin maturasyon vasatında östradiol-17 β bulunmasının kumulus ekspansiyonunu ve blastosist gelişimini düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Vasatlara yüksek oranda östradiol-17 β eklenmesi anormal nükleer maturasyona neden olmaktadır (Younis ve ark., 1989). İğ ipliklerinin

formasyonunda ve kutup cisimciği atılımında olumsuz etki yaratmaktadır (Bevers ve ark., 1997).

Sığır IVM'sinde östradiol genellikle 1 µg/ml dozunda kullanılmaktadır (Brackett ve ark., 1989; Fukui ve Ono, 1989; Younis ve ark., 1989; Liu ve ark., 1991; Bevers ve ark., 1997). Bu konsantrasyon, LH pikinden kısa bir süre sonraki preovülatör folliküldeki follikül sıvısının östradiol konsantrasyonudur (Bevers ve ark., 1997). Sirotkin (1992), östradiolün 5 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng ve 5 µg/ml dozlarını karşılaştırmıştır. En yüksek IVM oranı 100 ng/ml'lik grupta tespit edilmiştir.

Sirotkin (1992), 1 ve 5 µg/ml dozundaki progesteronu 50 ve 250 ng/ml'lik oranlara göre daha başarılı bulmuştur. Kullandığı 10 ng, 100 ng, 1 µg ve 5 µg/ml'lik testosteron gruplarında ise fark tespit edememiştir. Yapılan bir çalışmada; testosteron ve dihidrotestosteron 100 nmol/l, progesteron 300 nmol/l dozunda kullanılmıştır. Testosteron ve dihidrotestosteron blastosist oranını etkilemezken, progesteron düşürmüştür (Silva ve Knight, 2000).

Gonadotropinler

Memeli oositlerinin hücre siklusu daha önce de belirtildiği gibi fötal yaşamda profaz l'in diploten aşamasında durmaktadır. Durgun mayozis oositin maturasyonunun tekrar başladığı ovulasyon öncesinde birden devam etmeye başlar. Maturasyon sürecinde; oositi fertilizasyon ve erken embriyonik gelişime hazırlayan, nükleer ve sitoplazmik düzeyde değişiklikler olur. Aynı dönemde oosit maturasyonu için esas olan intraselüler değişiklikler olmaktadır (Ocana ve ark., 1999). İn vivo olarak bütün bu olayların gonadotropinlerce tetiklendiğine inanılmaktadır. Bu nedenle gonadotropinler in vitro sistemler içerisinde kullanılmaktadır (Bevers ve ark., 1997; Ocana ve ark., 1999). Ancak, IVM protokolü ile in vivo maturasyon süreci arasında iki belirgin farklılık yer almaktadır. Bunlardan biri, LH piki sırasında preovülatör

folliküllerdeki follikül sıvısında FSH ve LH konsantrasyonları sırasıyla 2 ng/ml ve 6 ng/ml olmasına rağmen IVM çalışmalarında sırasıyla 10 µg/ml ve 1 µg/ml civarında kullanılmıştır. Diğeri ise küçük ve orta tipteki 2-8 mm çaplı folliküllerden alınan oositlerde IVM denemelerinin yapılmasıdır. Bu folliküllerin mural granuloza hücrelerinde, FSH reseptör mRNA bulunmasına rağmen preovulatoör folliküllerden farklı olarak LH reseptör mRNA yer almamaktadır. Yapılan reseptör taramalarında; mRNA-LH reseptörlerine sadece teka hücrelerinde rastlanırken, mRNA-FSH reseptörleri oosit hariç kumulus, granuloza ve follikül duvarında belirlenmiştir (Bever ve ark., 1997).

Gonadotropinler; gap junctionlarda inhibitör maddelerin yapısını bölerek mayozun tekrar başlamasını uyarmakta ve ayrıca kumulus hücrelerinin metabolizmasını değiştirmektedir. In vivo olarak oositlerde maturasyonu gerçekleştiren spesifik uyarıcı, preovulatorik gonadotropin salınımıdır (Sanbuissho ve Threlfall, 1990). Gonadotropinlerin preovulatorik salınımlarının etkilerinden biri de granuloza hücrelerinin mayozu durdurucu etkilerini baskılamaktır. Vasatlarda yüksek oranlarda FSH ve LH bulunması mayozun ve sitoplazmik maturasyonun yeniden başlamasına izin vermektedir (Ocana ve ark., 1994). Ayrıca LH, oositlerin enerji kaynağı olarak kullandığı adenozin trifosfatın (ATP) kullanılabilirliğini artırmaktadır (Brackett ve Zuelke, 1993; Soom ve Kruif, 1996).

In vitro maturasyon uygulamalarında, FSH ve LH veya bunların kombinasyonları son zamanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, gonadotropinlerin maturasyona, sonraki fertilizasyona ve erken embriyonik gelişime etkileri ve ilgileri tartışmalıdır (Bever ve ark., 1997). Fukui ve Ono (1989), in vitro maturasyon vasatlarında LH kullanımının maturasyon sonuçlarını etkilemediğini, daha sonraki fertilizasyonu ve embriyonik gelişimi artırdığını bildirmiş, Gliedt ve ark. (1996a) ise vasatta equine LH varlığının kumulus ekspansiyonunu ve blastosist gelişimini artırdığını bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar equine LH'nın biyolojik aktivitesinin diğerevcil hayvanların LH'sına göre daha güçlü olduğunu kaydetmişlerdir. Younis ve ark. (1989),

vasata FSH eklenmesinin kumulus hücrelerinin ekspansiyon derecelerini artırdığını ve yüksek oranda penetrasyon ve pronükleus formasyonu gözlediklerini kaydetmektedir. Bevers ve ark. (1997), gonadotropin preparatlarındaki farklılıklardan dolayı bulguların tartışmalı olduğu görüşünü savunmaktadır.

İnsan menopozal gonadotropini (hMG); menopoz dönemindeki kadınların ve ovariohisterektomi operasyonu 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 (Niemann ve Meinecke, 1993; Döcke, 1994).

İn vitro maturasyonda LH kullanımı, glikolizle birlikte mitokondrial glikoz oksidasyonunun artmasına neden olmaktadır. Luteinleştirici hormon, oositleri çevreleyen kumulus hücrelerinde Trikarboksilik Asit (TCA) siklik aktivitesinin artmasına neden olur. İn vitro maturasyonda LH kullanımının TCA'nın siklik aktivitesine etkisini ortaya koymak için bu hücrelerdeki glutaminin CO₂'ye dönüşümü saptanmaktadır. Glutamin metabolizması sadece LH uygulanan kumulus hücreleriyle kaplı oositlerde artmaktadır. Diğer, LH kullanılmayan kumulus hücreleriyle kaplı oositlerde ve LH uygulanan fakat oositten ayrılmış kumulus hücrelerinde bir değişiklik olmamaktadır. İn vitro maturasyondan önce çıplaklaştırılan oositlerde LH kullanımı glutamin metabolizmasını etkilememektedir (Brackett ve Zuelke, 1993).

Oositlerin IVM'den önce veya sonra çıplaklaştırılmasına bağlı olarak TCA siklus aktivitesinde oluşan fark, kumulus hücrelerinin oositin metabolizmasında yararlı etki gösterdiğini doğrulamaktadır. İn vitro maturasyon vasatına pürivat eklenmesi bazal TCA siklik aktivitesini artırmaktadır. Glikoz içeren vasatlarda LH uyarımına cevap olarak kumulus

hücrelerinde pürivat üretimi artmaktadır ve buna bağlı olarak TCA siklik aktivitesi de etkilenmektedir (Brackett ve Zuelke, 1993).

Fertilizasyon kapasitesi ve embriyonik gelişimi tamamlayabilme yeteneği çoğunlukla gelişim yeteneği olarak tanımlanır. Bu gelişim yeteneğini kazanmak için sadece nükleer maturasyonu gerçekleştirmek yetmez, aynı zamanda sitoplazmada çeşitli biyokimyasal değişikliklerin olması şarttır. İmmatür sığır oositlerinin kültüründe follikül hücrelerini etkileyen östrojen (E₂) ve gonadotropinlerin birlikte kullanılması ile oositlerin in vitro sitolojik maturasyonlarının arttığı ve böylece embriyonik gelişim yeteneği kazandıkları tespit edilmiştir (Liu ve ark., 1991).

Bevers ve ark. (1997), yaptıkları bir çalışmada FSH ve hCG hormonlarının IVM'ye etkilerini karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda; FSH'nın maturasyonu olumlu etkilediğini, hCG'nin (0,05 IU/ml, 8 ng/ml) ise etkili olmadığını bildirmişlerdir.

Gonadotropinlerin IVM vasatlarında EGF veya IGF-I'le (İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü) (10 ng/ml) kombine edildiğinde LH'nın 50 µg/ml, FSH'nın 10 µg/ml dozunda kullanılabileceği bildirilmektedir (Brackett ve Zuelke, 1993).

Brackett ve ark. (1989), yüksek LH konsantrasyonunun maturasyona ve fertilizasyondan sonraki canlılığa etkilerini araştırmışlar, yüksek LH'nın (100 µg/ml) düşük LH (10 µg/ml) düzeyine göre daha fazla maturasyon ve erken embriyonik gelişim sağladığını belirlemişlerdir.

Büyüme Hormonu, Prolaktin ve Tiroid Uyarıcı Hormon

Büyüme hormonu (GH), folliküler büyümede ve gelişimde rol almaktadır. İneklerde gonadotropinlerle veya öncesinde GH uygulamalarıyla daha iyi

süperovulasyon sonuçları sağlanmaktadır. Follikül uyarıcı hormondan az olmasına rağmen oositlerin serumsuz bGH ile maturasyonunda, nükleer maturasyonun hızı ve kumulus ekspansiyonu artmıştır. Nükleer maturasyonun hızlanmasının sonucu olarak, GH ile 16 saatlik kültürde M II'deki oositlerin sayısında artış gözlenmiştir. Ancak 24 saatlik kültür sonunda M II'ye ulaşan oosit sayısı etkilenmemiştir (Bevers ve ark., 1997).

Kumulus hücrelerinde GH reseptör mRNA belirlenmiştir. Bu durum çıplak oositlerin bGH ile matüre edildiklerinde GVBD'nin durmasını açıklamaktadır. Büyüme hormonu oositlerdeki etkilerini iki yol üzerinden yapmaktadır. Bunlardan biri, GH'nin reseptörlere bağlanarak sinyallerin aktarımı sonucu, direk olarak maturasyonu uyarmasıdır. Diğeri ise oosit maturasyonunu uyarıcı IGF'nin gen aktarımını veya sentezini artırarak indirek olarak etkilemesidir (Bevers ve ark., 1997).

Prolaktin (PRL), çeşitli hayvanların östrus siklusu düzeni içerisinde yer almaktadır. İneklerde, ne korpus luteumun (CL) fonksiyonu ne de antral follikül gelişimi PRL'den etkilenir. Luteinleştirici hormon pikinden sonra preovülatör folliküllerin follikül sıvılarında, PRL konsantrasyonlarının dalgalanma göstermesi nedeniyle sığır oositlerinin in vivo maturasyonunda bu hormonun regülatör rolünün olmadığı düşünülmektedir. İn vitro maturasyon vasatlarına PRL eklenmesi sığır oositlerinin gelişim kapasitesini artırmamaktadır. Benzer şekilde ratlarda da nükleer maturasyonu etkilememektedir (Bevers ve ark., 1997). Ancak Kuzmina ve ark. (1999), PRL'nin M II'ye ulaşan oosit sayısını artırdığını, kromozom dejenerasyonlarını azalttığını bildirmişlerdir. Anılan çalışmada PRL, 50 ng/ml dozunda kullanılmıştır.

Memeli oositlerinin maturasyonunda tiroid uyarıcı hormonun (TSH) düzenleyici fonksiyonları üzerine pek çalışma yapılmamıştır ve kumulus hücrelerinde veya oositlerde TSH reseptörlerinin varlığı araştırılmamıştır. Bevers ve ark. (1997), 0,5 µg/ml dozunda TSH'nin kumulus ekspansiyonunu,

erken embriyonik bölünme oranını, morula ve blastosist sayısını artırdığını, Brackett ve Zuelke (1993) ise in vitro maturasyon vasatlarında TSH kullanımının glikolizisi artırdığını bildirmişlerdir.

1.4.7.2. Serumlar

Memeli oositlerinin in vitro maturasyonunu artırmak için vasatlara çeşitli serum katkıları eklenmektedir. Sığır oosit maturasyonu için sıklıkla kullanılan serum preparatları; fetal ya da yeni doğan buzağı serumu (FCS, NCS) ve sığır serum albuminidir (BSA) (Younis ve ark., 1989). Serumlar ve bunun albumin fraksiyonu, protein katkısı olarak temel elemanları teşkil etmektedir. Serum albuminin olumlu etkisi nispeten daha ağır molekül içermesine bağlanmaktadır (Sanbuissho ve Threlfall, 1990; Ocana ve ark., 1994; Ocana ve ark., 1999). Oositlerdeki germinal vezikül parçalanmasını ve maturasyonu uyarmak için vasatlara serum eklenmesinin şart olduğu bildirilmektedir (Sanbuissho ve Threlfall, 1990). Aynı şekilde Greve ve Madison (1991) da kumulüs ekspansiyonu ve maturasyonun tamamlanması için serumun şart olduğunu kaydetmişlerdir.

Serum in vitro maturasyondaki yararlı etkilerini cAMP, katekolaminler, vitaminler, büyüme faktörleri, lipidler ve albumin sayesinde gerçekleştirmektedir (Ocana ve ark., 1999).

Serumlar, sıklıkla %10-20'lik oranlarda kullanılmaktadır (Sanbuissho ve Threlfall, 1990; Schellander ve ark., 1990; Ocana ve ark., 1994; Gliedt ve ark., 1996b; Ocana ve ark., 1999).

Östrustaki İnek Serumu (ECS)

Östrustaki inek serumu, 1987 yılından beri yaygın olarak kullanılmakta (Gliedt ve ark., 1996a) ve maturasyon vasatlarına ekonomik şekilde hormon katkısı sağlamaktadır. Bu serum, yüksek düzeyde hormon içermesinin yanı sıra in vitro oosit maturasyonunu uyaran bazı proteinleri ve büyüme faktörlerini içermektedir (Trounson, 1992; Ocana ve ark., 1994; Ocana ve ark., 1999). Ancak östrusun dönemine göre alınan serumun içeriği aynı hayvanda bile değişmektedir (Greve ve ark., 1993).

Ocana ve ark. (1999), ECS'nin in vitro maturasyonu desteklediğini bildirmişler ve bu yararlı etkisini içerdiği kısmen yüksek LH hormonuna bağlamışlardır. Luteinleştirici hormonun kumulus hücreleriyle oosit etkileşiminin kesilmesinden ve GV aşamasında duran maturasyonunun devam etmesinden sorumlu olduğunu kaydetmişlerdir.

Süperovulasyon için uyarılan ineklerden alınan ECS'de, FSH düşük olmasına rağmen normal siklustan elde edilen ECS'ye göre daha başarılıdır. Artan follikül sayısından dolayı süperovule olan ineklerdeki ECS, yüksek konsantrasyonda E_2 içermektedir. Östrojen granuloza hücrelerinin gelişiminden kısmen sorumludur (Gliedt ve ark., 1996a).

Fötal Buzağı Serumı (FCS)

In vitro maturasyon kültür sistemlerinde FCS'nin kullanılması avantaj sağlamaktadır. Bu durumun sebebi yetişkin hayvan serumunda bulunmayan ancak FCS'de bulunan ve tanımlanamamış gelişimi uyarıcı elemanları (fetuin gibi) içermesine bağlanmaktadır (Sanbuissho ve Threlfall, 1990; Ocana ve ark., 1994; Ocana ve ark., 1999). Fötal buzağı serumu da yararlı etkisini ECS'ye benzer şekilde hormonlar, proteinler ve büyüme faktörleri gibi komponentleri sayesinde gerçekleştirmektedir. Bu komponentler GVBD'de ve

mayozun tekrar başlamasında etkili olmaktadır (Ocana ve ark., 1999). Ayrıca FCS'de eksik olup (hormonlar, immunglobulinler) yetişkin serumunda var olan, in vitro gelişimi geciktirici bazı elemanların etkili olabileceğinden de bahsedilmektedir (Sanbuissho ve Threlfall, 1990).

Yukarıda adı geçen glikoprotein yapıdaki fetuinin, fare oositlerinin maturasyonu sırasında zona pellusidanın sertleşmesini engellediği ve in vitro maturasyon oranlarını artırdığı bildirilmiştir (Ocana ve ark., 1999).

Fötal buzağı serumunda, aminoasitlerin veya diğer makromoleküllerin yerini alamayacağı, fötal peptid büyüme faktörü ya da faktörleri bulunmaktadır. Muhtemelen bunlar, in vitro maturasyonda ve embriyonik hücre gelişiminde birincil rol oynamaktadırlar. Diğer taraftan yukarıda da belirtildiği gibi ECS'de embriyonik gelişim için zararlı etkileri olan immunglobulin ve diğer embriyotoksik elemanların bulunabileceği bildirilmektedir (Liu ve ark., 1991).

1.4.7.3. Büyüme Faktörleri

Canlı hayvanlarda preantral aşamadan preovülütör aşamaya kadar follikül gelişimi ve ovulasyon, gonadotropik hormonlar tarafından düzenlenmektedir. Bu hormonlar folliküllerdeki etkilerini, lokal olarak üretilen parakrin ve otokrin büyüme faktörleri üzerinden gerçekleştirmektedirler (Bever ve ark., 1997).

İn vivo ortamda, stimülatör ve inhibitör etkilerinin olduğu bilinen bu moleküllerin, oosit ve embriyo gelişiminden, yara iyileşmesi, kemik rejenerasyonu, anjiyogenezin de olduğu bir çok konuyla olan ilişkisine tam olarak açıklık getirilememektedir. Oosit ve erken embriyonik gelişimle ilgili büyüme faktörleri; TGF- α,β , IGF-I,II, FGF, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), VEGF, büyüme farklılaşma faktörü (GFG) şeklinde sıralanmaktadır (Bulgurcuoğlu ve ark., 2003).

Teka hücrelerinin ve/veya granuloza hücrelerinin membran reseptörlerine (membrane-bound receptors) bağlanarak biyolojik aktivitelerini gösteren bu büyüme faktörlerinin üretimi ve sekresyonu, follikülün çapı ve kalitesi ile yakından ilişkilidir. İnsulin benzeri büyüme faktörü-I, IGF-II ve aktivin gibi bazı büyüme faktörlerinin aktiviteleri lokal olarak üretilen bağlanma proteinlerince (IGF bağlanma proteinleri ve follistatin) kontrol edilir (Bever ve ark., 1997).

Epidermal büyüme faktörü kullanımı ile sığır oositlerinde, kumulüs ekspansiyonu ve nükleer maturasyon artmaktadır. Çıplak oositler EGF ile kültüre edildiklerinde nükleer maturasyon etkilenmemektedir. Bu durum EGF'nin etkisini kumulüs hücreleri üzerinden gösterdiğinin kanıtı olarak açıklanmaktadır. Transforming büyüme faktörü- α , EGF ile fonksiyonel ve yapısal olarak benzerlik göstermektedir ve EGF reseptörlerine bağlanmaktadır. Bu nedenle, kumulüs ekspansiyonu ve maturasyonu üzerine etkileri benzerdir (Bever ve ark., 1997). Im ve Park (1995), vasatlarda EGF kullanımının (10, 30, 50 ng/ml) maturasyonu artırdığını bildirmişlerdir.

Sığır oositlerinin IVM'sinde IGF-I'in kullanımı M II'ye ulaşan oosit sayısını artırmaktadır fakat kumulüs ekspansiyonunu etkilememektedir. Çıplak oositlerin maturasyonunda IGF-I'in kullanımı etkili olmamaktadır (Bever ve ark., 1997).

1.4.7.4. Hücreler

Kumulüs ve Granuloza Hücreleri

Sığır oositlerinin sitoplazmik ve nükleer maturasyonunu, kumulüs/granuloza hücrelerinin uyardığı ve yine bu hücrelerin fertilizasyon oranını ve sonraki gelişim potansiyelini artırdığı Fukui ve Ono (1989) ve Gordon (1994)

tarafından bildirilmiştir. Maturasyonda kullanılan kumulus ve granuloza hücre yoğunluğunun $3-5 \times 10^6$ /ml oranında olduğu kaydedilmiştir (Greve ve ark., 1993; Gordon, 1994). Richard ve Sirard (1996) ise çalışmalarında granuloza hücrelerini 1×10^6 /ml oranında kullanmışlar ve maturasyonu uyardığını bildirmişlerdir.

Granuloza hücrelerinin sekresyonları, oositin glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine) sentezini artırmaktadır. Glutathione seviyesi maturasyon esnasında artmakta, fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim döneminde azalmaktadır. Ayrıca erkek pronükleus oluşumunda da önemli role sahiptirler (Konishi ve ark., 1996).

İn vitro maturasyonu desteklemek için kullanılan kumulus hücreleri türe özgü değildir. Domuz kumulus hücrelerinin koyun oositlerinde, tavşan kumulus hücrelerinin sığır oositlerinde IVM'yi artırdığı belirlenmiştir (Gordon, 1994).

Yapılan bir çalışmada granuloza hücrelerinin maturasyona etkileri araştırılmıştır. Dört kalite oositin değerlendirildiği çalışmada en iyi kalitedeki oositlerin bulunduğu grup hariç diğerlerinde maturasyon sonuçlarını artırmıştır. İyi kalitedeki oositlerde maturasyon sonuçları aynı kalmıştır (Konishi ve ark., 1996).

Tekal Hücreler

İn vitro maturasyon sistemlerinde kumulus, granuloza ve bu hücrelerin kombinasyonları sıklıkla kullanılmasından dolayı tekal hücreler nadiren tercih edilmektedir. Tekal hücreler, androjenlerin en önemli kaynağıdır ve hem folliküler gelişimde hem de granuloza hücre proliferasyonunda görev alan büyüme faktörlerini sentezlemektedir (Gordon, 1994).

Tekal hücrelerin IVM vasatlarında süspansiyon ve manolayer hücre tabakası şeklinde kullanılması maturasyon sonuçlarını ve sonraki gelişim aşamalarını artırmaktadır (Gordon, 1994). Richard ve Sirard (1996), tekal hücreleri $1,5-2 \times 10^5/\text{ml}$ dozunda kullanmışlar ve maturasyonun baskılandığını tespit etmişlerdir.

Oviduktal Hücreler

Granulosa ve kumulus hücreleri ile başarılı kültürler yapılması oviduktal hücrelerle kültürleri yaygınlaştırmamıştır. İneklerde ovidukt, final maturasyonun ve fertilizasyonun gerçekleştiği yerdir. Sığır oositlerinin IVM'sinde oviduktal hücrelerin olumlu bir çevre sağlayacağı bildirilmektedir (Gliedt ve ark., 1996a).

Sığır ovidukt epitel hücreleri, dominant follikülün (8-10 mm) bulunduğu taraftaki oviduktan toplanmaktadır. Doku kültür vasatı 199'da, %20'lik serumla süspansiyon edilen hücreler daha sonra kültür pleytlerine alınarak hücre kültürleri oluşturulmaktadır (Gliedt ve ark., 1996a).

1.4.7.5. Sığır Follikül Sıvısı (bFF)

İn vivo olarak oositler, follikül sıvısı içerisinde bulunduğu için IVM vasatlarına bu sıvının eklenmesi denenmiştir (Romero ve Seidel, 1996). Sığır follikül sıvısı (bFF), bir serum transudatı olup folliküler metabolik aktiviteler nedeniyle follikül duvarı hücreleri tarafından sentezlenen steroidleri ve glikoproteinleri içermektedir. Folliküler büyüme sırasında serum ve follikül sıvısı arasında kurulan dengeden dolayı metabolit konsantrasyonları birbirine benzemektedir (Gordon, 1994).

Yapılan bir çalışmada, LH dalgasının GnRH (Gonadotropin Salınım Hormonu) ile uyarılmasını takiben 0., 8. ve 20. saatlerde toplanan follikül sıvılarının %10 ve %40'lık konsantrasyonları denenmiştir. Bu gruplar içerisinde en fazla kumulat ekspansiyonun görüldüğü grup 20. saatteki her iki konsantrasyon olmuştur. Benzer şekilde en düşük erken embriyonik bölünme oranı 0. saatteki grupta gerçekleşmiştir. Bu durumun sebebi mayotik inhibitörlerin varlığına bağlanmıştır. En yüksek erken embriyonik bölünme oranı 20. saatte elde edilmesine rağmen kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Aynı çalışmada 0. ve 20. saatteki bFF'lerin kombinasyonlarının, 20. saatteki bFF'nin sonuçlarıyla benzer çıktığı belirlenmiştir. Yirminci saatteki mayoz uyarıcılarının 0. saatteki mayoz inhibitörlerini baskıladığı tespit edilmiştir (Romero ve Seidel, 1996).

Yapılan başka bir çalışmada, maturasyon vasatlarına bFF eklenmesi ECS, FCS ve sığır amnion sıvısına (bAF) göre daha düşük oranlarda maturasyon oranları sağlamıştır. Bu durum bFF'nin kompozisyonuna bağlanmıştır. Folliküler sıvıda maturasyonun inhibisyonunda aktif olan bazı proteik ve nükleotik moleküllerin var olduğu belirtilmektedir. Sığır follikül sıvısında fare oosit maturasyonunu durduran küçük bir peptid (<10 KD) izole edilmiştir. Ayrıca, bFF'de yine peptid yapıda oosit maturasyonunu durdurucu bir faktörün olduğu tespit edilmiştir. Bu peptidin yanında bir çok türde mayotik duraklamaya neden olan, azotlu bileşikler ve nükleotidler belirlenmiştir (Ocana ve ark., 1994).

Doku Kültürü Vasatı 199'a LH dalgasına maruz kalmış folliküllerden alınan follikül sıvısının eklenmesi ile IVM'de ve blastosist oluşumunda artış olmaktadır (Soom ve Kruif, 1996).

Gordon (1994), sığır follikül sıvısının seyreltilmemiş şekilde (%100) maturasyon vasatı olarak kullanılmasında mayoz bölünmenin durduğunu belirlenmiş, benzer etki in vitro maturasyon vasatında %40'lık seviyede kullanılmasında da görülmüştür. Sığır oositlerinin maturasyonunda, vasatta

kullanılan follikül sıvısının en uygun konsantrasyonunun %20 olduğu tespit edilmiştir.

1.4.7.6. Sığır Serum Albumini (BSA)

İn vitro maturasyon vasatlarında, serum ve BSA makro moleküllü protein kaynakları olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak hazırlanan preperasyonları saf olarak üretilmemesinden dolayı, bu katkıyı içeren herhangi bir in vitro maturasyon vasatı kimyasal olarak tanımlanamaz (Gordon, 1994).

Sığır serum albumini vasatlarda 6 mg/ml dozunda kullanılmaktadır (Gordon, 1994; Ocana ve ark., 1999).

1.4.7.7. Sığır Amnion Sıvısı (bAF)

Ocana ve ark. (1994), IVM açısından bAF'ın etkisini, ECS ve FCS'nin etkileri ile benzer bulduklarını bildirmişlerdir. Sığır amnion sıvısının maturasyonu uyarıcı etkisinin ECS ve FCS'de de bulunan, maturasyonu durdurucu faktörleri nötralize edici bazı yapıları içermesinden kaynaklanacağı düşünülmektedir. Bu yapılardan hangilerinin bAF'da yer aldığı açık değildir. Ancak, ECS'ye benzer şekilde FCS ve bAF önemli düzeyde hormon (özellikle LH) içermektedir. Ayrıca oosit maturasyonunda kullanılan büyüme faktörleri gibi bazı yapılar bAF'da yer almaktadır. Adı geçen çalışmada bAF, 8-12 cm uzunluğunda embriyo bulunan gebeliklerden (5-10 haftalık) toplanmış ve vasatta %20 oranında kullanılmıştır.

1.4.7.8. Diğer Katkı Maddeleri

Sitokinler (interlökin 1 ve 6) (Gordon, 1994), östrustaki keçi serumu (OGS), anöstrustaki inek serumu (ACS) (Ocana ve ark., 1999), androjen antagonisti

(flutamid; 36 $\mu\text{mol/l}$), progesteron antagonisti (mifeprison, RU486; 100 nmol/l) (Silva ve Knight, 2000), heparin membran gelişim faktörü (midkine; 1-500 ng/ml) (Ikeda ve ark., 2000), hücre kültür mitojenleri (pokeweed mitojen, PWM; 10 $\mu\text{l/ml}$ ve fitohemaglutinin, PHA; 10 $\mu\text{l/ml}$) (Wang ve ark.,2001) in vitro maturasyon vasatlarında katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır.

1.4.7.9. Bazı Vasat Katkı Maddelerinin Karşılaştırılması

Östrustaki inek serumu ve FCS'nin, BSA'ya göre in vitro maturasyon açısından daha olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Younis ve ark., 1989; Sanbuissho ve Threlfall, 1990). Benzer şekilde; Greve ve Madison (1991), Gordon (1994) ve Ocana ve ark. (1994), FCS'nin sığır oositlerinin in vitro maturasyonunda BSA'ya göre daha yüksek oranda başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan Ocana ve ark. (1999), BSA'yı ECS ve FCS'ye göre daha başarılı bulmuş ancak istatistiksel yönden bu farkın önemli olmadığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada; BSA, ECS ve FCS'nin sonuçları OGS ve ACS'ye göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi ise OGS ve ACS'nin daha düşük düzeyde hormon ve büyüme faktörleri içermesine bağlanmıştır.

Östrustaki inek serumu, FCS ve gonadotropik hormonların in vitro maturasyon üzerine etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, ECS ve FCS daha başarılı bulunmuştur (Sanbuissho ve Threlfall, 1990). Ancak serumların (FCS, ECS), hormonların (FSH, LH, östradiol) ve granuloza hücrelerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise in vitro maturasyon oranlarında önemli bir fark tespit edilememiştir (Fukui ve Ono, 1989).

Liu ve ark. (1991), yaptıkları bir çalışmada FCS, ECS'ye göre in vitro maturasyon açısından daha başarılı bulunurken, bazı çalışmalarda ise (Schellander ve ark., 1990; Greve ve Madison, 1991) ECS, FCS'ye göre baskın bulunmuştur.

Yang ve ark. (1993), in vitro maturasyon vasatlarında serum (FCS) ve serumla birlikte hormon (FSH, LH, E₂) kullanılan oositlerin maturasyon sonuçlarını benzer bulmuşlardır.

Gordon (1994), IVM'de kullanılan tekal hücreleri, granuloza hücrelerine göre daha başarılı bulmuştur.

1.4.8. Kültür Şartları

Greve ve Madison (1991), vasat pH'sının 7,2-7,4 arasında ve ozmolaritesinin 285-300 mOsm arasında olması gerektiğini kaydetmişlerdir. Oosit yoğunluğunun 100 µ'lük vasat damlacıklarına 10 civarında ayarlanabileceğini, kültür ortamının 39 °C'de, %5 CO₂'li gaz atmosferinde, maksimum nem oranında ayarlanması gerektiğini ve sürenin 16-24 saat olabileceğini açıklamışlardır.

Gliedt ve ark. (1996b), tarafından 24 ve 28 saatlik maturasyon süresinin embriyonik gelişime etkisi araştırılmıştır. Adı geçen çalışmada, 24 saatlik maturasyonla daha fazla morula aşamasına gelen embriyo sağlanmıştır. Shamsuddin ve ark. (1993), I. kutup cisimciğinin atılmasının 18 saatlik inkubasyondan sonra başladığını tespit etmişlerdir. Ancak atılımın artmaya başladığı dönemi %5'lik CO₂'de 20 saat, atmosferde 24 saat olarak açıklamışlardır. Ayrıca kumulus hücrelerindeki ekspansiyonun kültürün 12. saatinde başladığı belirlenmiştir.

Xu ve ark. (1986), kültürün 6-12. saatlerinde GVBD'nin daha yoğun gerçekleştiğini, 24. saatinde ise en yüksek sayıda birinci kutup cisimciğinin atıldığını belirlemişlerdir. Perivitellin boşluğun 30. saatten sonra küçüldüğü tespit edilmiştir.

1.5. Maturasyonun Belirlenmesi

In vitro maturasyon çalışmalarında kullanılan başarı kriterleri oldukça fazladır. Bu amaçla kumulus ekspansiyonu, I. kutup cisimciğinin görülmesi, pronükleusların belirlenmesi, blastosist formasyonu, kromozom boyama yöntemleri gibi kriterler araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir (Greve ve Madison, 1991; Greve ve ark., 1993; Gordon, 1994; Ocana ve ark., 1994; Ocana ve ark, 1999). Gebeliğin de bir kriter olarak kullanılabileceği bildirilse de bu parametre çok fazla kabul görmemektedir (Greve ve ark., 1993).

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. Arzu edilen başarıya ulaşıldığı takdirde, embriyo üretiminde daha ucuz maliyet sağlanacaktır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Ovaryumların Toplanması ve Laboratuvara Getirilmesi

Çalışmada kullanılan ovaryumlar, Ankara ili Çubuk ilçesi Belediyesi'ne ait mezbahada kesilen inek ve düvelerden sağlandı. Karkaslardan alınan ovaryumlar mümkün olduğunca çevre dokulardan uzaklaştırıldı. 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.

Laboratuvara getirilen ovaryumlar, kandan ve taşıma vasatından uzaklaştırılmak amacıyla %0,9'luk NaCl ile iki kez yıkandı. Yıkanan ovaryumlar, sayılarak ısıtmalı tabla üzerine serilen kurutma kağıtlarına alındı ve 5 dakika süreyle kurumaya bırakıldı.

2.2. Follikül 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. Aspire edilen follikül sayısı kaydedildi. 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. Süre bitiminde üstteki süpernatant atıldı ve çalışılacak gruba göre hazırlanan vasattan eklenerek oositlerin yıkanması ve diğer hücrelerden ayrılmaları sağlandı. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandı.

Tüpteki oositler plastik petrilere alınarak seçme işlemi yapıldı. Seçme işlemi stereo mikroskop (x20-x80) altında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılacak oositler, Brackett ve Zuelke (1993)'nin tarif ettiği şekilde seçildi. Zona pellusidası sağlam, sitoplazması bir örnek kumlu görünümlü, çevresinde sıkı şekilde 4 ve daha yukarı kumulus hücre katı bulunan I. kalite oositler kullanıldı. Diğer oositler (çıplak, sitoplazması bozuk, zona pellusidası parçalanmış, çevresinde az miktarda kumulus hücresi bulunan) çalışma gruplarına alınmadı. Ancak hem iyi hem de kötü kalitedeki oositler sayılarak kaydedildi.

2.3. Deney Düzenegi

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

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

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

Grup 3 (kontrol): Hiçbir hormon katkısı olmaksızın sadece Heps'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.

2.4. Maturasyon Vasatlarına Uygulanan Son İşlemler

Gruplarda yer alan IVM vasatlarının tümüne, kullanılmadan bir gece önce antibiyotik-antimikotik, Na pürivat, L-Glutamin ve FCS eklendi. Antibiyotik-antimikotik olarak mililitresinde 10 000 IU penisilin, 10 mg streptomisin ve 25 μg amphoterisin B bulunan solüsyon (Sigma A 5955) kullanıldı. Bu solüsyondan vasatın mililitresinde 100 IU penisilin, 100 μg streptomisin ve 0,25 μg amphoterisin B olacak şekilde dozlama yapıldı. Ayrıca Na pürivat 22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (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.

2.5. Equilibrasyon ve Kültür Şartları

Tüm gruplarda kullanılan vasatlar, oositlerin maturasyonuna başlamadan 4 saat önce %5 CO₂'li atmosferde, 39 °C'de ve maksimum nem ortamında equilibrasyona bırakıldı. Equibrasyon 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 CO₂'li atmosferde, maksimum nem içeren ortamda gerçekleştirildi. Kültüre 24 saat sonra son verildi.

2.6. Kumulus Ekspansiyonunun Değerlendirilmesi

Süre bitiminde oositler kumulus ekspansiyonu açısından stereo mikroskopta incelendi. Oositler kumulus ekspansiyonu açısından Gordon'un (1994) 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.

2.7. Oositlerin Soyulması ve Kutup Cisimciğinin Aranması

Kumulus ekspansiyonu yönünden incelenen oositler; %0,02'lik tripsin solüsyonuna alındı ve 3 dakika süre ile vortekste çalkanarak çıplaklaştırıldı. Daha sonra, stereo mikroskop altında çıplak oositlerin perivitellin boşluklarında 1. kutup cisimciği aranarak kaydedildi.

2.8. Oositlerin Boyanması

Oositlerin Giemsa ile boyama işlemi; Ocana ve ark. (1999)'nın tarif ettiği sisteme benzer şekilde yapıldı. Bu amaçla, oositler taze hazırlanmış %0,9 Na sitrat solüsyonunda 15 dakika bekletilerek, kromozomların şişmesi sağlandı. Daha sonra oositlerin, asetik asit/methanol (1:1) karışımında 5 dakika bekletilmesiyle zona pellusidaları inceltildi. Bu sayede boyanın zona pellusidayı geçerek kromozomları boyayabilmesine imkan tanındı. Oositler, daha sonra 1:3'lük asetik asit/methanol solüsyonunda 24 saat süre ile tespit edildi.

Tespit işleminden sonra oositler temiz bir lam üzerine alınarak kısa bir süre (10-15 saniye) asetik asit/methanol karışımının uçması beklendi. Oositlerden hem tespit solüsyonunu uzaklaştırmak hem de oositlerin lama

yapışmalarını sağlamak için 1-2 damla saf methanol döküldü. Daha sonra lamın kuruması beklendi.

Üzerindeki kimyasalların uçması sağlanan lam, stok Giemsa solüsyonu ile kaplandı ve oositler 20-25 saniye süreyle boyandı. Süre bitiminde, fazla boya dökülerek lamın üzeri distile su ile yıkandı ve havada kurumaya bırakıldı. Lam kuruduktan sonra üzerine Kanada balzamu damlatılarak lamel ile kapatıldı.

2.9. Nükleer Maturasyonun Belirlenmesi

Hazırlanan preparatlar, ışık mikroskopta sırasıyla 10x10, 20x10, 40x10 büyütmede nükleer maturasyon açısından incelendi. Nükleer maturasyon; Germinal vezikül aşaması, Metafaz I (GVBD), Metafaz II ve dejenerasyon olmak üzere, Ocana ve ark.'nın (1999) 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 aşamasında kabul edildi. Maternal kromozomlarla kutup cisimciğinin belirlendiği oositler metafaz II grubuna alındı. Son olarak; vakuollü sitoplazması, dağılmış şekilde kromozom yapısı olanlar dejenere grubuna alındı.

2.10. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak ki-kare testi ile değerlendirildi.

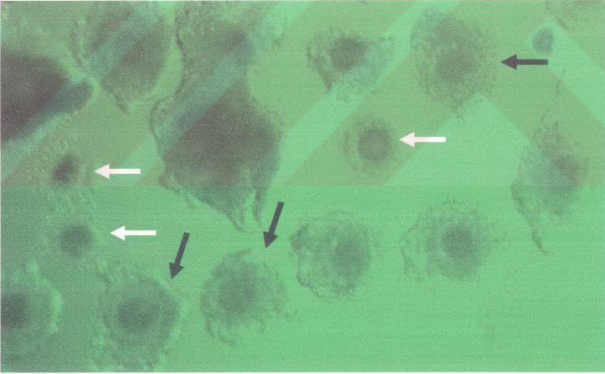
3. BULGULAR

3.1. Ovaryumların Toplanması

Çalışmanın materyali toplam 321 ovaryumdan sağlandı. Bu ovaryumlardan 109'u (%33,96) ile 1. grup, 127'si (%39,56) ile 2. grup ve 85'i (%26,48) ile 3. grup çalışıldı.

3.2. Aspirasyon İşlemi ve Toplanan Oositler

Mezbahadan getirilen ovaryumlardan toplam 2514 adet follikül aspirasyonu gerçekleştirildi. Ovaryum başına 7,83 adet aspirasyon düştüğü tespit edildi.



Şekil 3.1. İyi (siyah oklar) ve kötü (beyaz oklar) kalitede oositler. x40.

Aspirasyon işlemi sonucunda 556 adet iyi kalitede oosit toplandı. Aspire edilen, ancak iyi kalitede olmayan oosit sayısı ise 228 adet olarak belirlendi

(Şekil 3.1). Böylece tüm oositlerdeki aspirasyon başarısı %31,18 olarak tespit edildi. Elde edilen tüm oositlerin %70,91'ini I. kalite oositler oluşturdu.

Her ovaryumdan ortalama 2,44 adet oosit toplanırken, 1,73 adet iyi kalitede oosit elde edildi.

3.3. Equilibrasyon

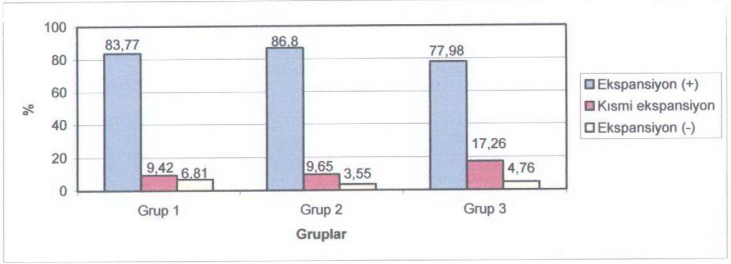
İn vitro maturasyonda kullanılan vasatların pH'larının, equilibrasyondan önce 7,35-7,45 arasında olduğu tespit edildi. Equibrasyon sonunda, maturasyona başlarken pH'larının 7,25-7,30 değerleri arasına indiği belirlendi.

3.4. Kumulus Ekspansiyonu

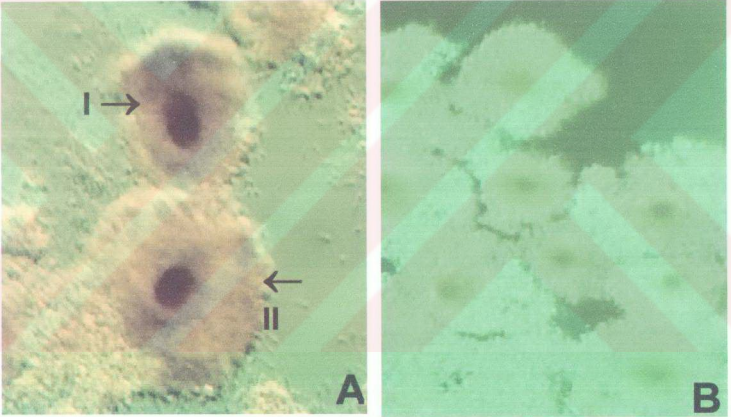
Maturasyon süresi sonunda 1. grupta %83,77 (160/191) oranında tam, %9,42 (18/191) oranında kısmi kumulus ekspansiyonu gerçekleşirken, %6,81 (13/191) oranında kumulus ekspansiyonu hiç gözlenmedi (Çizelge 3.1; Şekil 3.2; Şekil 3.3). Bu durum 2. ve 3. grupta sırasıyla %86,80 (171/197), %9,65 (19/197), %3,55 (7/197) ve %77,98 (131/168), %17,26 (29/168), %4,76 (8/168) olarak belirlendi. Gruplar arasında farklılığın istatistiki olarak önemli olmadığı gözlemlendi (p= 0,065).

Çizelge 3.1. Gruplarda görülen kumulus ekspansiyon oranları.

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			



Şekil 3.2. Gruplarda görülen kumulus ekspansiyon oranlarının grafiği.



Şekil 3.3. A. Kumulus ekspansiyonunun görülmediği (I) ve kısmi (II) olarak görüldüğü oositler. x60. B. Tam kumulus ekspansiyonu. x60.

3.5. Kutup Cisimciği

Grup 1'de, kumulus ekspansiyonu değerlendirildikten sonra çıplaklaştırılan oositlerin %75,91'inde (145/191) kutup cisimciği bulunurken (Şekil 3.5), bu oranlar Grup 2'de %67,51 (133/197), Grup 3'de %64,28 (108/168) olarak tespit

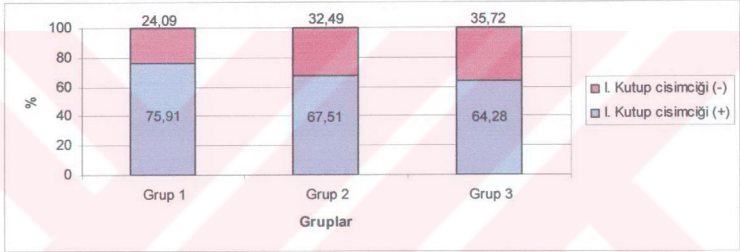
edildi (Çizelge 3.2; Şekil 3.4). İstatistiksel olarak gruplar arasında fark olduğu belirlendi. Farklılığı Grup 1'in yarattığı gözlemlendi ($p=0,045$).

Çizelge 3.2. Gruplarda belirlenen I. kutup cisimciği oranları.

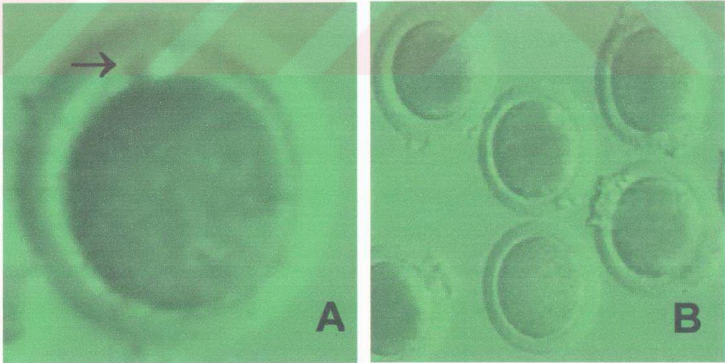
I. Kutup Cisimciği	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Var (n) %	(145) 75,91	(133) 67,51	(108) 64,28
Yok (n) %	(46) 24,09	(64) 32,49	(60) 35,72
İkili karşılaştırma	a	b	b

Ki-kare= 6,221; $p=0,045$

a,b: Farklı harf taşıyan gruplar arası fark istatistik olarak önemli ($p<0,05$).



Şekil 3.4. Gruplarda belirlenen I. kutup cisimciği oranlarının grafiği.



Şekil 3.5. A. Perivitellin boşluğunda I. kutup cisimciği (ok) belirlenen oosit. x80. B. Kutup cisimciği belirlenemeyen oositler. x60.

3.6. Nükleer Maturasyon Bulguları

Boyama işleminden önce %0,9'luk sodyum sitrat solüsyonuna alınan oositlerin oldukça fazla şiştiği görüldü (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Sodyum sitrat solüsyonunda şişen oositler. x60.

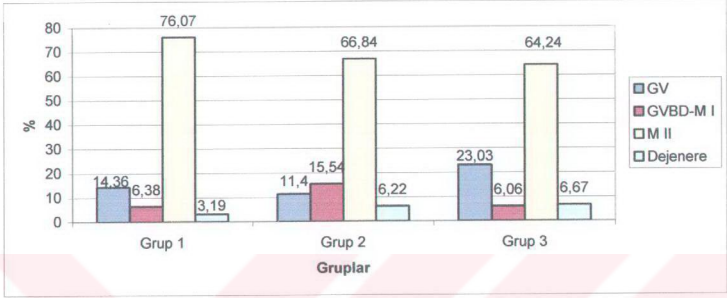
Çizelge 3.3. Nükleer maturasyon sonuçlarının gruplara göre dağılımı.

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			

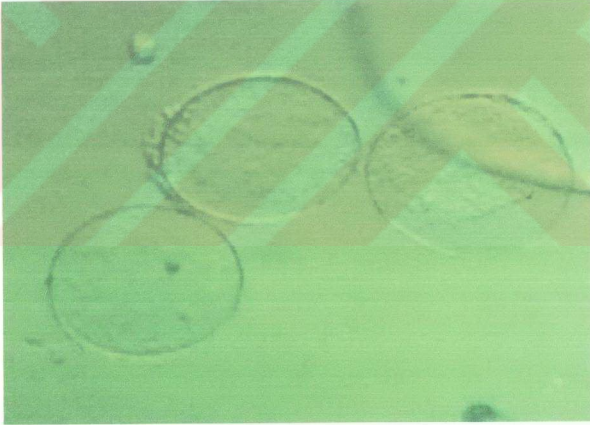
a,b,c: Farklı harf taşıyan gruplar arası fark istatistik olarak önemli ($p < 0,05$).

Çıplaklaştırılan oositlerin fiksasyonu ve boyanması sırasında, zona pellusidalarda meydana gelen incelmelere bağlı olarak (Şekil 3.8) 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 değerlendirilmeye alındı (Çizelge 3.3).



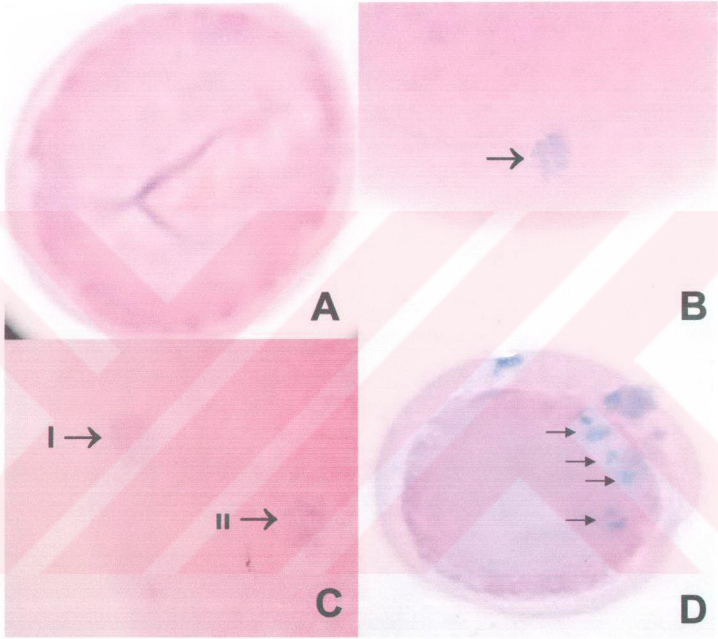
Şekil 3.7. Nükleer maturasyon sonuçlarının gruplara göre dağılımının grafiği.



Şekil 3.8. Fiksasyon solüsyonlarında zona pellusidaları incelen oositler. x60.

Grup 1'de yer alan oositlerin boyanması sonucunda 27'sinin GV (%14,36), 12'sinin M I (%6,38), 143'ünün M II (%76,07) ve 6'sının ise dejenere (%3,19) olduğu belirlendi. Bu oranlar Grup 2'de sırasıyla %11,40 (22), %15,54

(30), %66,84 (129), %6,22 (12), Grup 3'de ise %23,03 (38), %6,06 (10), %64,24 (106), %6,67 (11) olarak belirlendi (Şekil 3.7; Şekil 3.9). Gruplarda oluşan dağılımların istatistiki olarak birbirinden farklı olduğu tespit edildi ($p= 0,001$).



Şekil 3.9. A. Germinal vezikül aşaması. x200. B. Kromozomların (ok) saptanmasıyla belirlenen Metafaz I aşaması. x400. C. Kutup cisimciğindeki kromozomların (I) ve maternal kromozomların (II) belirlendiği Metafaz II aşaması. x400. D. Sitoplazmasında kromozomların (oklar) dağıldığı dejenere oosit. x200.

4. TARTIŞMA

İn vitro fertilizasyon çalışmalarında, ovaryumların laboratuvara ulaştırılmasında genellikle PBS ve %0,9 NaCl kullanılmaktadır (Greve ve ark. 1993; Thompson, 1997). Sunulan çalışmada mililitresinde 100 IU penisilin bulunan %0,9'luk NaCl tercih edildi. Benzer şekilde, mezbaha materyali laboratuvara ulaştığında kokuşmaya dair herhangi bir belirti bulunmadı.

Ovaryumların laboratuvara iletim süresi ve sıcaklığı üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Ancak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bunlar arasında; ovaryumların 8 saat süre ile 25 °C'de saklanabileceğini, 30 °C'nin altına düşmemesi gerektiğini ve 2 saat içerisinde maturasyonun başlatılmasını bildiren yayınlar bulunmaktadır (Greve ve ark., 1993; Gordon, 1994; Sirard ve Blondin, 1996). Sunulan çalışmada ise taşıma vasatı sıcaklığı 30-35 °C'ye ayarlandı ve maturasyona başlama süresi 6 saati geçirilmedi. Bu değerlerde ovaryumlarda veya toplanan oositlerde dejeneratif belirtilere rastlanmadı. Bu nedenle ovaryumların 30-35 °C'ye ayarlanmış, mililitresinde 100 IU penisilin bulunan %0,9'luk NaCl ile taşınabileceği ve 6 saat içerisinde kültüre başlanabileceği kanısına varıldı. Bu veriler, Thompson'ın (1997) taşıma vasatı sıcaklığının 30-35 °C'de olması gerektiğini bildirdiği yayını ile paralellik göstermiştir.

Sunulan çalışmada 2-7 mm'lik folliküller kullanıldı ve ortalama olarak 7,83 adet aspirasyon işlemi gerçekleştirildi. Elde ettiğimiz bu bulgu Küplülü ve Ün'ün (2000) 2-8 mm'lik folliküllerde yaptıkları çalışma sonuçlarına göre; gebe ineklerden, gebe olmayan düvelerden ve gebe olmayan ineklerden düşük, prepubertal dişilerden yüksek bulundu. Diğer taraftan Fry ve ark. (1997) 2-10 mm'lik folliküllerde yaptıkları çalışmada ortalama 7,39 adet, Ün (2002a) 2-7 mm'lik folliküllerde yaptığı çalışmada ise 5,11 adet follikül aspire etmişlerdir. Bu değerler çalışmada elde edilen ortalama aspirasyon sayısından düşüktür. Aspire

edilebilir follikül sayısındaki bu değişikliklerin; ovaryumların alındığı hayvanların yaş, ırk, beslenme ve fizyolojik konumlarının bilinmemesine bağlı olduğu düşünölmektedir.

Küplölü ve Ün (2000), yaptıkları çalışmada aspirasyon başarılarını %58 bulurken, yine Ün (2002a) bu oranı gruplarında %93,3 ve %91,7 olarak açıklamıştır. Bu çalışmalarda toplanan oositlerin %45,2; %20; %53,9; %53,2 (Küplölü ve Ün, 2000) ve %37,5; %49,2'sini (Ün, 2002a) I. kalite oositler oluşturmuştur. Hamano ve Kuwayama (1993), %22,1 aspirasyon başarısu bildirmiştir. Aspire ettiği oositlerin %41,3'ünün iyi kalitede olduğunu saptamıştır. Lonergan ve ark. (1994) ise %77 (6 mm'den büyük folliküllerde) ve %87,7 (2-6 mm'lik folliküllerde) oranlarında aspirasyon başarısu elde etmişlerdir. Bunların sırasıyla %70,2'si ve %46,8'i I. kalite oositlerden oluşmuştur. Fry ve ark., (1997) aspirasyon başarılarını %56 ve %45 olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise %31,18 aspirasyon başarısu tespit edildi. Bu oran, Küplölü ve Ün'ün (2000), Ün'ün (2002a), Lonergan ve ark.'nın (1994) bulgularından düşük, Hamano ve Kuwayama'nın (1993) bulgusundan yüksek bulundu. Ayrıca, aspirasyon tekniği ile %30-60 oranında başarı sağlanabileceğini bildiren Gordon'u (1994) destekler nitelikte göröldü. Aspirasyon başarılarında görölen bu dağılımın kişisel deneyime bağlı olduğu kanısına varıldı. Yapılan bir çalışmada (Fry ve ark., 1997), 3 operatörün yaptığı aspirasyonlarda, farklı (%54, %53, %46) aspirasyon başarısu elde edilmesi kişisel deneyimin önemini doğrular nitelikte bulundu.

Elde edilen oositlerin ortalama olarak %70,91'ini I. kalite oositler oluşturdu. Bu oran, Küplölü ve Ün'ün (2000), Ün'ün (2002a), Hamano ve Kuwayama'nın (1993) bulgularından yüksek bulundu. Lonergan ve ark.'nın (1994) 6 mm'den büyük folliküllerden elde ettikleri orana benzer, 2-6 mm'lik folliküllerdeki orandan yine yüksek olduğu göröldü. Enjektöre uygulanan aspirasyon basıncının kontrolsüz olması, hem aspirasyon başarısu hem de iyi kalite oosit toplanmasında değişkenliklere neden olduğu kanısına varıldı. Bols

ve ark.'nın (1996) aspirasyon basıncıyla, iyi kalite oosit sayısının yakından ilişkili olduğu bulgusu, bu sonucumuzu destekler niteliktedir.

Sunulan çalışmada, her ovaryumdan ortalama 2,44 adet oosit toplandı. Bu bulgu, Küplülü ve Ün'ün (2000) (6,2), Fry ve ark.'nın (1997) (4,2), Ün'ün (2002a) (4,77) sonuçlarından oldukça düşük bulundu. Yine bu çalışmada ovaryum başına düşen ortalama iyi kalitede oosit sayısı (1,73), Ün'ün (2002a) bulgusundan (3,51) düşük çıkmıştır. Sonuçlardaki bu değişkenlikler, enjektöre uygulanan aspirasyon basıncının ve kullanılan iğnelerin farklı olmasına bağlandı.

In vitro maturasyon prosedüründe, vasat pH'larını 7,4'e ayarlamak amacıyla bir çok çalışmada equilibriasyon yöntemi kullanılmıştır (Stubbings ve ark., 1990; Lonergan ve ark., 1994; Romero ve Seidel, 1996; Avery ve Greve, 2000; Ali ve Sirard, 2002). Ancak equilibriasyon sürelerinde bir örneklik bulunmamaktadır. Bu süreyi Stubbings ve ark. (1990) ve Lonergan ve ark. (1994) en az 2 saat, Ali ve Sirard (2002) en az 3 saat, Avery ve Greve (2000) 3-4 saat, Romero ve Seidel (1996) 1 gece olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise 4 saat equilibriasyon işlemi yapıldı. Bu süre zarfında vasatın pH'sının 7,35-7,45'den 7,25-7,30'a gerilediği belirlendi. Equibriasyon sonunda sağlanan pH değerleri, Greve ve Madison'un (1991) IVM vasatları için bildirdiği 7,2-7,4'lük pH değerlerine uygun görüldü. Bu nedenle pH değeri 7,35-7,45 arasında olan TCM 199 vasatının (Sigma M 2520) %5 CO₂'li atmosferde, 4 saatlik inkubasyonun equilibriasyon için yeterli olduğu kanısına varıldı.

Kumulus hücrelerinin, gonadotropinler ve büyüme faktörleri tarafından uyarılmasıyla hiyaluronik asit üretilmekte ve kumulus ekspansiyonu olarak adlandırılan hücrelerde çözümler meydana gelmektedir (Gordon, 1994). Benzer şekilde LH, FSH, TSH hormonlarıyla kumulus ekspansiyonunun arttığı (Zuelke ve Brackett, 1992); büyüme hormonu salınım hormonu (GHRH) ve VIP

kullanımıyla etkilenmediği (Beker ve ark., 2000) ve polivinil alkol (PVA) eklenmesiyle azaldığı (Landim ve ark., 2002), fetuin eklenmesiyle azaldığı (Landim ve ark., 2002) ve etkilenmediği (Ün, 2002b) 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 (1994) görüşünü desteklemedi. Aynı şekilde Calder ve ark. (2001), Gordon'dan (1994) farklı olarak, 50 ng/ml'nin üzerinde kullanılan PGE₂'nin (Prostaglandin E) kumulus ekspansiyonunu uyardığını bildirmişlerdir.

Luciano ve ark. (2004) yaptıkları bir çalışmada, hMG hormonunun kumulus ekspansiyonunu artırdığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde Choi ve ark. (2001), FSH ve LH'nin birlikte kullanımlarını ayrı ayrı kullanımlarına göre daha başarılı bulmuşlardır. Sunulan çalışmada ise FSH etkisinin yanında LH etkisi de olan hMG hormonunun diğer iki gruptan farklı bulunmaması, adı anılan araştırmacıları desteklemedi.

Gonadotropik hormon bulunmayan 3. grupta; %77,98 oranında tam, %17,26 oranında kısmi kumulus ekspansiyonu görülmesi, vasatta bulunan FCS'ye bağlandı. Fötal buzağı serumunun hormon ve büyüme faktörleri ihtiva ettiği bir çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir (Sanbuissio ve Threlfall, 1990; Liu ve ark., 1991; Ocana ve ark., 1994; Ocana ve ark., 1999).

Kumulus ekspansiyon oranlarını Çetin (2004) %95,14, Lorenzo ve ark. (1995) %74,2 ve %75,9, Liu ve ark. (1991) %80 ve %86 olarak tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada ortaya çıkan kumulus ekspansiyon oranları; Çetin'den (2004) düşük, Lorenzo ve ark.'dan (1995) yüksek, Liu ve ark.'na (1991) benzer bulunmuştur. Çetin (2004); yaptığı çalışmada vasata FSH ve östradiol eklemiştir. Lorenzo ve ark. (1995), EGF ve IGF-I'i katkı maddesi olarak kullanmışlardır. Liu ve ark. (1991) ise FSH, LH ve östradiölü vasata eklemiştir. Kumulus

ekspansiyonlarında görülen bu farklılıkların, eklenen değişik katkı maddelerine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda elde edilen kumulüs ekspansiyon oranları, metafaz II'ye ulaşan oosit oranlarından farklı bulundu. Bu nedenle kumulüs ekspansiyonunun tek başına maturasyon kriteri olarak kullanılamayacağı kanısına varıldı. Benzer şekilde bazı araştırmacılar da kumulüs ekspansiyonunun tam bir maturasyonu ifade etmediğini bildirmişlerdir (Gordon, 1994; Kaya ve Ün, 2003). Bu durumun sebebi ise kumulüs ekspansiyonunun bazen oosit maturasyonundan bağımsız olarak gerçekleşmesine bağlanmaktadır (Gordon, 1994).

Oositlerin çıplaklaştırılmasından sonra Grup 1'de %75,91, Grup 2'de %67,51 ve Grup 3'de %64,28 oranında I. kutup cisimciği bulundu. Grup 1'in, Grup 2 ve 3'den farklı olduğu belirlendi ($p < 0,05$). Grup 3'de elde edilen IVM sonucu, Younis ve ark.'nın (1989) aynı şekilde oluşturdukları vasatta saptanan bulgudan (%59,2) yüksek bulundu. Adı anılan çalışmanın FSH grubunun başarısının (%87,9), Grup 1'deki sonuçlardan yüksek olduğu görüldü. Diğer taraftan Keefer ve ark.'nın (1993) bulunduğu orandan (%65) yüksek, Çetin'in (2004) bulgusuna (%74,76) benzer olduğu tespit edildi. Hem FSH hem de LH etkisi bulunan hMG hormonunun IVM oranlarının kontrol grubuna benzer bulunması, FSH ve LH'nin birlikte kullanımının daha faydalı etkiler oluşturduğunu bildiren Sanbuissho ve Threlfall'u (1990), Choi ve ark.'nı (2001) desteklemedi. Diğer taraftan IVM'de FSH'nin daha etkili olduğunu bildiren Bevers ve ark.'nın (1997) bulgularına benzer bulundu. In vitro maturasyon oranlarındaki bu farklılıklar, kullanılan hormonların dozlarının ve diğer katkı maddelerinin değişken olmasına bağlandı.

Çalışmamızda oluşan IVM sonuçlarıyla; hMG'nin sığır oositlerinde vasat katkı maddesi olarak kullanılmasının FSH'ya göre daha düşük başarı oranları sağladığı ve bu nedenle maturasyon amacıyla kullanımının uygun olmadığı

belirlendi. Ancak hMG'nin az da olsa IVM'yi uyarması Rieger ve ark.'nın (1998) bulgusuna benzer bulundu. Rieger ve ark. (1998), hMG'nin olumlu etkisini pirüvat metabolizmasını uyararak yaptığını bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada; oositlerin boyanmasıyla elde edilen nükleer maturasyon sonuçlarını istatistiksel yönden karşılaştırdığımızda, gruplarda oluşan dağılımların birbirlerinden farklı olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). 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 belirlendi. Diğer taraftan gruplarda sırasıyla %6,38, %15,54 ve %6,06 oranlarında maturasyonun başladığı, ancak tamamlanamadığı (GVBD-M I) tespit edildi. Grup 2'de diğer gruplara göre düşük düzeyde GV, yüksek düzeyde GVBD-M I aşamasında oosit görülmesi vasatta hMG'nin yetersiz miktarda olabileceğini düşündürdü. Germinal vezikül aşamasındaki oositlerin Grup 3'de en yüksek seviyede belirlenmesi, mayozun tekrar başlatılmasında gonadotropik hormonların etkili olduğunu bildiren Younis ve ark.'nı (1989), Greve ve Madison'u (1991), Trounson'u (1992), Sirard ve Blondin'i (1996) 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.

In vitro maturasyon vasatlarında FSH kullanan bazı araştırmacılar, farklı oranlarda (Çetin (2004), %79,60; Sanbuissho ve Threlfall (1990), %60,6-61,4; Mikkelsen ve ark., (2000), %85) M II'ye ulaşan oosit bildirmişlerdir. Sonuçlardaki bu farklılıklar, kullanılan diğer katkı maddelerine (östradiol, ECS gibi) bağlandı. Sunulan çalışmada vasata FSH eklenmesiyle M II'ye ulaşan oositlerde artış olması, FSH kullanımının IVM'yi etkilemediğini bildiren Becker ve ark.'nı (2002) 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 %62,4-64,8 (Sanbuissho ve Threlfall, 1990), %81,2-90,3 (Shamsuddin ve ark., 1993), %32-49-71-81 (Leibfried ve ark., 1989) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmalarda kültür şartları, serum, maturasyona koyulan oosit sayılarındaki değişkenlikler, IVM sonuçlarını sunulan çalışmaya göre farklı kılmıştır. Ancak sunulan çalışmanın nükleer maturasyon sonuçlarıyla da sığır oositlerinin IVM'sinde FSH hormonunun hMG'ye göre daha uygun olduğu belirlendi.

Çalışmada Grup 1'de 145 oositte I. kutup cisimciğine rastlanırken, yine bu grupta boyama sonucu 143 oositin nükleer maturasyonunun M II döneminde olduğu belirlendi. Bu durum Grup 2 ve 3'te sırasıyla 133'e 129, 108'e 106 olarak tespit edildi. Elde ettiğimiz sonuçlarla, IVM çalışmalarında kutup cisimciğinin belirlenmesinin maturasyon için uygun bir kriter olduğu kanısına varıldı. Kutup cisimciğinin IVM'de güvenilir bir kriter olarak belirlenmesi; Kaya ve Ün'den (2003) farklı, Gordon'a (1994) benzer bulundu.

Nükleer maturasyonun tam olarak belirlenmesi amacıyla çeşitli boyama teknikleri kullanılmaktadır. Bu amaçla aceto-orcein ve DAPI (4,6 diamino-2-phenylindole) boyaarı sıklıkla tercih edilmektedir (Ayoub ve Hunter, 1993; Shamsuddin ve ark., 1993; Lim ve ark., 1999; Ali ve Sirard, 2002; Beker ve ark., 2002). Ancak, sunulan çalışmada Giemsa ile boyanan oositlerin nükleer maturasyonları kolaylıkla belirlendi. Bu nedenle maliyeti fazla olan aceto-orcein ve özel ekipman gerektiren (fleurosan mikroskop) DAPI yerine, ucuz olan ve kolay bulunabilen Giemsa boyanın rahatlıkla kullanılabileceği kanısına varıldı. Benzer şekilde Ocana ve ark. (1994), Ocana ve ark. (1998), Cetica ve ark. (1999), Ocana ve ark. (1999), Çetin (2004) nükleer maturasyonun belirlenmesinde Giemsa boyamanın yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Maturasyon sonrası kumulüs ekspansiyonu bakımından yapılan değerlendirmede, gruplar arasında oluşan farkların önemli olmadığı saptandı.
2. Kumulüs ekspansiyonu oranları ile M II'ye ulaşan oosit sayılarının farklı bulunması nedeniyle, kumulüs ekspansiyonunun maturasyon kriteri olarak kullanılamayacağı tespit edildi.
3. Maturasyon sonrası KOK'ların soyulması ile yapılan kutup cisimciği muayenelerinde; FSH'nın kullanıldığı Grup 1'de en yüksek, kontrol grubu olarak çalışılan Grup 3'de en düşük oranda kutup cisimciği belirlendi.
4. Oositlerin boyanmasıyla Grup 1'de %76,07; Grup 2'de %66,84 ve Grup 3'de %64,24 oositin M II'ye ulaştığı tespit edildi. Dejenere oosit oranları ise sırasıyla; %3,19; %6,22 ve %6,67 şeklinde oluştu. Grup 1'de M II'ye ulaşan oositin fazla ve dejenere oositin az olması nedeniyle FSH'nın avantaj oluşturduğu kanısına varıldı.
5. Gruplarda, I. kutup cisimciği belirlenen oosit sayısı ile M II'ye ulaşan oosit sayısının benzer olması nedeniyle, oosit içerisinde kutup cisimciği aranarak maturasyon tespiti yapılabileceği belirlendi.
6. Oosit boyanmasında Giemsa boyanın rahatlıkla kullanılabileceği kanısına varıldı.
7. Ovaryumların mezbahadan laboratuvara getirilmesinde, taşıma vasatı olarak antibiyotikli NaCl'nin kullanılmasına bağlı herhangi bir olumsuz etki ile karşılaşılmadı. Taşıma sıcaklığının 30-35 °C olabileceği ve ovaryumların karkasdan alınmasından oositlerin kültürüne başlanana kadar geçen sürenin 6 saat olabileceği gözlendi.

8. Doku kültürü vasatı 199'un (Hepes'li); 7,35-7,45'lik pH değerlerinde %5 CO₂'li atmosferde, 4 saatlik equilibrasyonlarında pH'nın uygun değerlere inebileceği tespit edildi.

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.



ÖZET

Siğir Oositlerinin İn Vitro Maturasyonuna Follikül Uyarıcı Hormon ve İnsan Menopozal Gonadotropini'nin Etkisi

Bu çalışmanın amacı; benzer gonadotropinlere göre daha ucuz olan ve kolay bulunabilen FSH (Follikül Uyarıcı Hormon) ve hMG (İnsan Menopozal Gonadotropini) hormonlarının siğir oositlerindeki in vitro maturasyon oranlarına etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışma materyalini, Ankara ili Çubuk ilçesi Belediyesi'ne ait mezbahada kesilen hayvanlardan alınan 321 adet ovaryum oluşturdu. Bu ovaryumlardan 2514 adet follikül aspirasyonu ile 556 iyi kalitede oosit toplandı. 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.

Grup 1'de, kontrol vasatına ek olarak FSH (Folltropin®-V, Vetrepharm, Kanada) 25 µg/ml dozunda ilave edildi. Grup 2'de, kontrol grubunda kullanılan vasata 0,1 IU/ml hMG (Pergonal®, Serono, İsviçre) hormonu eklendi. Kontrol grubunda ise hiçbir hormon katkısı olmaksızın sadece Hepes'li (N-(2 hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2 ethanesulponicacid)) TCM 199 (Doku Kültürü Vasatı 199) vasatı kullanıldı. Maturasyon işlemi; %5 CO₂ içeren maksimum nemli ortamda, 39 °C'de ve 24 saatte gerçekleştirildi. Süre sonunda, oositlerdeki kumulus ekspansiyonu incelendi ve soyularak kutup cisimciği arandı. Daha sonra fiksasyon yapılarak Giemsa boyama ile nükleer maturasyon değerlendirildi.

Grup 1'deki 191 oositin 160'ında (%83,77) tam, 18'inde (%9,42) kısmi kumulus ekspansiyonu olurken 13'ünde (%6,81) kumulus ekspansiyonu hiç gözlenmedi. Bu durum 2. ve 3. Grupta sırasıyla %86,80 (171/197), %9,65 (19/197), %3,55 (7/197) ve %77,98 (131/168), %17,26 (29/168), %4,76 (8/168) olarak belirlendi. Gruplar arasındaki farklar istatistik açıdan önemli bulunmadı (p>0,05). Kumulus ekspansiyonu değerlendirildikten sonra çıplaklaştırılan oositlerin Grup 1'de %75,91'inde (145/191), Grup 2'de %67,51'inde (133/197) ve Grup 3'de %64,28'inde (108/168) kutup cisimciği tespit edildi. Grup 1'in Grup 2 ve 3'den istatistik olarak farklı olduğu gözlemlendi (p<0,05). Grup 1'de Giemsa ile boyaması yapılan 188 oositin 27'sinin (%14,36) GV (Germinal Vezikül), 12'sinin (%6,38) M I (Metafaz I), 143'ünün ise (%76,07) M II döneminde olduğu belirlenirken, 6 adetinin (%3,19) dejenere olduğu tespit edildi. Grup 2'de ise 193 oositin 22'si (%11,40) GV, 30'u (%15,54) M I, 129'u (%66,84) M II döneminde iken, 12 oositin (%6,22) dejenere olduğu gözlemlendi. Grup 3'de 165 oositin 38'i (%23,03) GV, 10'u (%6,06) M I, 106'sı (%64,24) M II ve 11'i (%6,67) dejenere olarak kabul edildi. 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, siğir oositlerinin in vitro maturasyonunda vasat katkı maddesi olarak FSH kullanımının hMG'ye göre daha başarılı olduğu belirlendi. Bununla birlikte, siğir 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 gonadotropini, in vitro maturasyon, oosit, siğir.

SUMMARY

The Effect of Follicle Stimulating Hormone and human Menopausal Gonadotrophin on In Vitro Maturation of Bovine Oocytes

The aim of this study was to investigate the effects of FSH (Follicle Stimulating Hormone) and hMG (human Menopausal Gonadotrophin) which are both easy to obtain and cheap when compared to other gonadotrophins, on in vitro maturation of bovine oocytes.

Total of 321 bovine ovaries, obtained from a local abattoir in Çubuk, Ankara, was used in the study. 556 good quality oocytes were picked up by aspiration of 2514 follicles on the ovaries. According to hormone added to in vitro maturation media, three groups were formed; Group I (FSH), Group II (hMG) and Group III (Control).

In group I, 25 µg/ml of FSH (Follitropin®-V, Vetrepharm, Canada) was added to control media. In group II, 0.1 IU/ml of hMG (Pergonal®, Serono, Switzerland) was added to control media. Hepes (N-(2 hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2 ethanesulponicacid)) buffered TCM 199 (Tissue Culture Media 199) medium was used in the control group without any hormone supplementations. Oocytes were matured for 24 hours at 39 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Cumulus expansion was evaluated, oocytes were denuded and checked for polar body. Oocytes were fixed and nuclear maturation was evaluated by Giemsa staining.

160 oocytes (83.77%) in group I had undergone full cumulus expansion while 18 oocytes (9.42%) had undergone partial cumulus expansion. No cumulus expansion was observed in 13 oocytes (6.81%) in group I. The results in groups II and III were as 86.80% (171/197), 9.65% (19/197), 3.55% (7/197) and 77.98% (131/168), 17.26% (29/168), 4.76% (8/168), respectively. The differences between groups were not statistically important ($p > 0.05$). Polar body identified in 75.91% (145/191), 67.51% (133/197) and 64.28% (108/168) of oocytes following removal of cumulus cells in groups I, II and III, respectively. Result in group I was statistically different from those in groups II and III ($p < 0.05$). Giemsa staining of 188 oocytes in group I revealed that 27 oocytes (14.36%) were at GV (Germinal Vesicle) stage, 12 oocytes (6.38%) were at M I (Metaphase I) stage and 143 oocytes (76.07%) were at M II stage while 6 oocytes (3.19%) degenerated. Number of oocytes at stages GV, M I and M II in group II were 22 (11.40%), 30 (15.54%) and 129 (66.84%), respectively. 12 of 193 oocytes (6.22%) in group II were degenerated. Control group had 38 (23.03%) GV stage, 10 (6.06%) M I stage and 106 (64.24%) M II stage oocytes. 11 oocytes (6.67%) in this group were degenerated. 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 gonadotrophin, in vitro maturation, oocyte.

KAYNAKLAR

- ALI, A., SIRARD, M.A. (2002). Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.*, **66**: 901-905.
- ANDERSON, G.B. (1991). Fertilization, early development, and embryo transfer. In: *Reproduction in Domestic Animals*, Ed.: P.T. Cupps, California: Academic Press, p.: 279-313.
- ARLOTTO, T., SCHWARTZ, J.L., FIRST, N.L., LEIBFRIED, R.M.L. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, **45**: 943-956.
- AVERY, B., GREVE, T. (2000). Effects of ethanol and dimethylsulphoxide on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.*, **55**: 438-445.
- AYOUB, M.A., HUNTER, A.G. (1993). Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. *J. Dairy Sci.*, **76**: 95-100.
- BAĞIŞ, H., SAĞIRKAYA, H. (2001). Klonlama. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.*, **20**: 187-198.
- BEKER, A.R.C.L., COLENBRANDER, B., BEVERS, M.M. (2002). Effect of 17 β -estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, **58**: 1663-1673.
- BEKER, A.R.C.L., IZADYAR, F., COLENBRANDER, B., BEVERS, M.M. (2000). Effect of growth hormone releasing hormone (GHRH) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on in vitro bovine oocyte maturation. *Theriogenology*, **53**: 1771-1782.
- BEVERS, M.M., DIELEMAN, S.J., HURK, R., IZADYAR, F. (1997). Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, **47**: 13-22.
- BOLS, P.E.J., SOOM, A.V., YSEBAERT, M.T., VANDENHEEDE, J.M.M., KRUIF, A.D. (1996). Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, **46**: 1001-1014.
- BRACKETT, B.G., YOUNIS, A.I., FAYRER, H.R.A. (1989). Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertil. Steril.*, **52**(2): 319-324.
- BRACKETT, B.G., ZUELKE, K.A. (1993). Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, **39**: 43-64.
- BULGURCUOĞLU, S., ÖZSAIT, B., ATTAR, E. (2003). Büyüme faktörlerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerindeki etkisi. *Artemis*, **4**(1): 18-26.

- CALDER, M.D., CAVENEY, A.N., WESTHUSIN, M.E., WATSON, A.J. (2001). Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ (PGE₂) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE₂ induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biol. Reprod.*, **65**(1): 135-140.
- CALLESEN, H., GREVE, T., CHRISTENSEN, F. (1987). Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, **27**: 217.
- CETICA, P.D., PINTOS, L.N., DALVIT, G.C., BECONI, M.T. (1999). Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on in vitro maturation. *Theriogenology*, **51**: 541-550.
- CHOI, Y.H., CARNEVALE, E.M., SEIDEL, G.E., SQUIRES, E.L. (2001). Effectes of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*, **56**: 661-670.
- CORTVRINDT, R., SMITZ, J. (2001). In vitro follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reprod. Dom. Anim.*, **36**: 3-9.
- ÇETİN, Y. (2004). İmmatür sığır oositlerinin vitrifikasyon tekniği ile etilen glikol ve DMSO kullanarak payetlerde dondurulması. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- DÖCKE, F. (1994). Wirkungen der keimdrüsenhormone. In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie*, Ed.: F. Döcke, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena, p.: 418-508.
- FRY, R.C., NIALL, E.M., SIMPSON, T.L., SQUIRES, T.J., REYNOLDS, J. (1997). The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, **47**: 977-987.
- FUKUI, Y., ONO, H. (1989). Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, **86**: 501-506.
- GLIEDT, D.W., ROSENKRANS, C.F., RORIE, R.W., MUNYON, A.L., PIERSON, J.N., MILLER, G.F., RAKES, J.M. (1996a). Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *J. Dairy Sci.*, **79**: 536-542.
- GLIEDT, D.W., ROSENKRANS, C.F., RORIE, R.W., RAKES, J.M. (1996b). Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. *J. Dairy Sci.*, **79**: 532-535.
- GORDON, I. (1994). Laboratory Production of Cattle Embryos, Wallingford: CAB International, p.: 30-142.
- GREVE, T., MADISON, V. (1991). In vitro fertilization in cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.*, **31**: 147-157.
- 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.

- HAMANO, S., KUWAYAMA, M. (1993). In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*, **39**(3): 703-712.
- HASHIMOTO, S., TAKAKURA, R., KISHI, M., SUDO, T., MINAMI, N., YAMADA, M. (1999). Ultrasound-guided follicle aspiration: The collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology*, **51**: 757-765.
- HURK, R., BEVERS, M.M., BECKERS, J.F. (1997). In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology*, **47**: 73-82.
- IKEDA, S., ICHIHARA, T.K., AZUMA, T., MURAMATSU, T., YAMADA, M. (2000). Effects of midkine during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence. *Biol. Reprod.*, **63**: 1067-1074.
- IM, K.S., PARK, K.W. (1995). Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, **44**: 209-216.
- KAYA, Z.P., ÜN, M. (2003). Sığır oositlerinin in vitro maturasyonunun belirlenmesinde kullanılan kriterlerin etkinliğinin karşılaştırılması. *I. Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi Konya*, 62.
- KEEFER, C.L., STICE, S.L., DONRINSKY, J. (1993). Effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during bovine in vitro maturation on development following in vitro fertilization and nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, **36**: 469-474.
- KESKİNTEPE, L., BRACKETT, B.G. (1996). In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod.*, **55**: 333-339.
- KONISHI, M., AOYAGI, Y., TAKEDOMI, T., ITAKURA, H., ITOH, T., YAZAWA, S. (1996). Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*, **45**: 573-581.
- KRISHER, R.L., BAVISTER, B.D. (1998). Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, **49**: 103-114.
- KUZMINA, T.I., LEBEDEVA, I.Y., TORNER, H., ALM, H., DENISENKO, V.Y. (1999). Effects of prolactin on intracellular calcium in the course of bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*, **51**: 1363-1374.
- KÜPLÜLÜ, Ş., ÜN, M. (2000). Mezbahadan elde edilen sığır ovaryumlarında yüzeysel follükül potansiyelinin belirlenmesi ve oosit aspirasyonu. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **47**(3): 247-254.
- KÜPLÜLÜ, Ş., ÜN, M. (2001). Sığırlarda follükül büyüklüğünün oositlerin in vitro maturasyonu üzerine etkisi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **48**(3): 201-205.

- LANDIM, A.F.C., BOYAZOGLU, S.E.A., CARVALHO, L.R., CHOI, Y.H., SQUIRES, E.L., SEIDEL, G.E. (2002). Effects of fetuin on zona pellucida hardening, fertilization and embryo development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, **71**: 181-191.
- LEIBFRIED, R.M.L., CRITSER, E.S., FIRST, N.L. (1985). Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology*, **23**(5): 753-759.
- LEIBFRIED, R.M.L., CRITSER, E.S., PARRISH, J.J., FIRST, N.L. (1989). In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, **31**(1): 61-74.
- LIM, J.M., LEE, B.C., LEE, E.S., CHUNG, H.M., KO, J.J., PARK, S.E., CHA, K.Y., HWANG, W.S. (1999). In vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. *Reprod. Fertil. Dev.*, **11**: 127-132.
- LIU, J.M., JIN, Z.Q., ZHAO, X.X., ZHU, Y.D. (1991). The development of bovine follicular oocytes matured in different culture media. *Vet. Res. Com.*, **15**: 257-260.
- LONERGAN, P., MONAGHAN, P., RIZOS, D., BOLAND, M.P., 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.
- LORENZO, P.L., ILLERA, M.J., ILLERA, J.C., ILLERA, M. (1995). Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology*, **44**: 109-118.
- LUCIANO, A.M., MODINA, S., VASSENA, R., MILANESI, 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**(2): 465-472.
- MARIANA, J.C., MONNIAUX, D., DRIANCOURT, M.A., MAULEON, P. (1991). Folliculogenesis. In: *Reproduction in Domestic Animals*, Ed.: P.T. Cupps, California: Academic Press, p.: 119-171.
- MEINTJES, M., BELLOW, M.S., BROUSSARD, J.R., PAUL, J.B., GODKE, R.A. (1993). Transvaginal aspiration of bovine oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for IVF. *Theriogenology*, **39**: 266.
- MIKKELSEN, A.L., SMITH, S., LINDENBERG, S. (2000). Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. *Hum. Reprod.*, **15**: 11-17.
- NIEMANN, H., MEINECKE, B. (1993). In vitro produktion von embryonen. In: *Embryotransfer und Assoziierte Biotechniken bei Landwirtschaftlichen Nutztieren*, Ed.: H. Niemann, B. Meinecke, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, p.: 86-103.
- OCANA, Q.J.M., MERLIN, M.P., ORTEGA, M.M., MILLAN, M.M. (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.

- OCANA, Q.J.M., MILLAN, M.M., CORDOBA, M.V., FRANGANILLO, A.R. (1994). The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, **41**: 405-411.
- OCANA, Q.J.M., MORENO, M.M., PINEDO, M.M., MARISCAL, M.O. (1998). An improved method for chromosome preparations from bovine oocytes and zygotes obtained by in vitro maturation and fertilization techniques. *Arch. Zootec.*, **47**: 669-675.
- OOE, M., RAJAMAHENDRAN, R., BOEDIONO, A., SUZUKI, T. (1997). Ultrasound-guided follicle aspiration and IVF in dairy cows treated with FSH after removal of the estrous cycle. *J. Vet. Med. Sci.*, **59**: 371-376.
- PIETERSE, M.C., KAPPEN, K.A., KRUIP, A.M., TAVERNE, M.A.M. (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, **30**(4): 751-762.
- PIETERSE, M.C., VOS, P.L.A.M., KRUIP, A.M., WURTH, Y.A., BENEDEN, H.V., WILLEMSE, A.H., TAVERNE, M.A.M. (1991). Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, **35**(1): 19-24.
- PIETERSE, M.C., VOS, P.L.A.M., KRUIP, A.M., WURTH, Y.A., BENEDEN, H.V., WILLEMSE, A.H., TAVERNE, M.A.M. (1992). Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows. *Theriogenology*, **37**(1): 273.
- RICHARD, F.J., SIRARD, M.A. (1996). Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol. Reprod.*, **54**: 22-28.
- RIEGER, D., LUCIANO, A.M., 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**(1): 123-130.
- ROMERO, A.A., SEIDEL, G.E. (1996). Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development. *Biol. Reprod.*, **55**: 1012-1016.
- SANBUISSHO, A., THRELFALL, W.R. (1990). The influence of serum and gonadotropins on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, **34**(2): 341-348.
- SCHANS, A., WESTERLAKEN, L.A.J., WIT, A.A.C., EYESTONE, W.H., BOER, H.A. (1991). Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*, **35**(1): 288.
- SCHELLANDER, K., FUHRER, F., BRACKETT, B.G., KORB, H., SCHLEGER, W. (1990). In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology*, **33**(2): 477-485.
- SHAMSUDDIN, M., LARSSON, B., RODRIGUEZ, M.H. (1993). Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.*, **31**: 49-60.

- SILVA, C.C., KNIGHT, P.G. (2000). Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, **119**: 261-269.
- SIRARD, M.A., BLONDIN, P. (1996). Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, **42**: 417-426.
- SIROTKIN, A.V. (1992). Involvement of steroid hormones in bovine oocytes maturation in vitro. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **41**: 855-858.
- SOOM, A.V., KRUIF, A.D. (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.
- STUBBINGS, R.B., WALTON, J.S., ARMSTRONG, D.T., BASRUR, P.K. (1990). Recovery of bovine oocytes from small vesicular follicles for in vitro maturation and fertilization. *Vet. Res. Com.*, **14**: 71-81.
- ŞEVİKTÜRK, İ.M. (1998). Tavşan oositlerinin in vitro maturasyonu, fertilizasyonu ve transferi üzerinde çalışmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- THIBAULT, C., SZÖLLÖSI, D., GÉRARD, M. (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Develop.*, **27**(5): 865-896.
- THOMPSON, J.G. (1997). Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.*, **9**: 341-354.
- TROUNSON, A. (1992). The production of ruminant embryos in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, **28**: 125-137.
- ÜN, M. (2002a). Mezbahadan toplanan ovaryumlardan elde edilen sığır oositlerinin in vitro maturasyonu ve fertilizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ÜN, Z.P. (2002b). Östrustaki sığır serumu ve fetuin'in sığır oositlerinin in vitro maturasyonu üzerine etkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- WANG, S., PANTER, K.E., EVANS, R.C., BUNCH, T.D. (2001). The effects of pokeweed mitogen (PWM) and phytohemagglutinin (PHA) on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, **67**: 215-220.
- WASSARMAN, P.M. (1988). The mammalian ovum. In: *The physiology of reproduction*, Ed.: E. Knobil, J.D. Neill, New York: Raven Press, p.: 69-102.
- WIT, A.A.C., WURTH, Y.A., KRUIP, A.M. (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.
- XU, K.P., GREVE, T., SMITH, S., HYTTEL, P. (1986). Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet. Scand.*, **27**: 505-519.

- YANG, X., JIANG, S., FOOTE, R.H. (1993). Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol. Reprod. Dev.*, **34**: 94-100.
- YANG, X., KUBOTA, C., SUZUKI, H., TANEJA, M., BOLS, P.E.J., PRESICCE, G.A. (1998). Control of oocyte maturation in cows-biological factors. *Theriogenology*, **49**: 471-482.
- YOUNIS, A.I., BRACKETT, B.G., FAYRER, H.R.A. (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.*, **23**: 189-201.
- ZUELKE, K.A., BRACKETT, B.G. (1992). Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured in vitro. *Endocrinology*, **131**(6): 2690-2696.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Hasan Ceyhun
Soyadı: Macun
Doğum yeri ve tarihi: İstanbul, 11/10/1975
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Evli
Askerlik durumu: Tecilli
İletişim adresi ve telefonu: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kırıkkale.
0 505 269 24 05

II- Eğitimi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi / Ankara, 1993-1998
Ayrancı Lisesi / Ankara, 1989-1992
Ayrancı Lisesi (Orta Kısmı) / Ankara, 1986-1989
Salih Alptekin İlkokulu / Ankara, 1984-1986
Teğmen Kalmaz İlkokulu / Ankara, 1981-1984
Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

Araştırma Görevlisi 1999-

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimler Derneği
Veteriner Jinekoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

1.Küplülü Ş., Çetin Y., Macun H.C., Taşdemir U. Akkaraman ırkı koyunlarda transrektal ve transabdominal ultrasonografi yöntemi ile erken gebelik tanı sınırlarının belirlenmesi. Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg. 42(2002), 25-33.

- 2.Çiftci A., **Macun H.C.**, Yardımcı H., Vural R. Sağlıklı dişi köpeklerin genital kanalının bakteriyel florası, 5. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (2002), Konya.
- 3.Alaçam E., Oral H., **Macun H.C.** Kedi ve köpeklerde gebelik, hayali gebelik ve embriyonik-fötal ölümlerin tanısı amacıyla kan relaksin hormonu düzeylerinin değerlendirilmesi, II. Ulusal Küçük Hayvan Hekimliği Kongresi (2003), Bursa.
- 4.Kaçar C., Özyurtlu N., **Macun H.C.**, Zonturlu A.K., Saban E., Aslan S. Akkaraman ırkı koyunlarda ve Ankara keçilerinde servikal mukus kaynatma testi ile gebelik tanısı, I. Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi (2003), Konya.
- 5.Kaymaz M., Vural S., **Macun H.C.** Köpek uterusunda farklı siklus dönemleri, gebelik ve CEH-pyometra olgularında östrojen ve progesteron reseptörlerinin belirlenmesi, I. Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi (2003), Konya.
- 6.**Macun H.C.**, Kaymaz M. Sığırlarda in vitro fertilizasyon. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi (Eylül-Aralık 2003), 47-52.
- 7.Çiftci A., **Macun H.C.**, Yardımcı H., Vural R. Sağlıklı dişi köpeklerin genital kanalının aerobik bakteriyel florası. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi 3(2003), 27-30.
- 8.**Macun H.C.**, Kaymaz M. Sığır embriyolarının in vitro kültürü. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi (Ocak-Mart 2004), 29-33.
- 9.**Macun H.C.**, Özyurtlu N. Endometrial Polyps and Adenoma in a cat with Hydrometra: Case Report. Turk J Vet Anm Sci 28(2004), 447-449.
- 10.Kaymaz M., Yağcı İ.P., **Macun H.C.** Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Kliniğine 1987-2001 yılları arasında getirilen hayvanların genel analizi. Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg. 1(2004), 35-41.
- 11.Kaçar C., Özyurtlu N., **Macun H.C.**, Zonturlu A.K., Saban E., Aslan S. Akkaraman ırkı koyunlarda ve Ankara keçilerinde servikal mukus kaynatma testi ile gebelik tanısı. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 51(2004), 199-204.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Seminerleri:

1. In vitro fertilizasyon ve fertilizasyon sürecinde kullanılan biyoteknolojik yaklaşımlar. (2001)
2. Sığır embriyolarının in vitro kültürü. (2001)

