



Folikül Büyüklüğü ve Folikül Uyarıcı Hormon Konsantrasyonunun Sığır Oositlerinin İn Vitro Nükleer Olgunlaşması Üzerine Etkisi

Uğur Şen^{*}, Emre Şirin, Ercan Soydan

Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 40100 Kırşehir, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Geliş 18 Şubat 2015
Kabul 25 Mart 2015
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

Anahtar Kelimeler:
Oosit
Folikül büyüklüğü
FSH
İn vitro olgunlaştırma
Sığır

^{*} Sorumlu Yazar:
E-mail: ugur.sen@ahievran.edu.tr

ÖZET

Bu çalışma folikül büyüklüğü ve folikül uyarıcı hormon (FSH) konsantrasyonunun sığır oositlerinin in vitro nükleer olgunlaşması üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Sığır ovaryumundaki (87 adet) foliküller küçük (<3 mm, 128 adet), orta (3–8 mm, 168 adet) ve büyük (9–12 mm, 148 adet) olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır. Farklı büyüklüklerdeki foliküllerden aspire edilen oositler, %10 FCS ve farklı konsantrasyonlarda FSH (0,5; 1,0 ve 10,0 µg/ml) içeren doku kültür medyumunda (TCM–199) 22 saat süreyle 38,5°C’de, %5 CO₂ ve yaklaşık %95 oranında nem içeren ortamda in vitro olgunlaştırılmaya alınmışlardır. Kültür işlemi sonunda oositlerin nükleer olgunlaşmaları (MII; Metafaz II safhasına ulaşanlar) bisbenzimid (Hoechst 33258) DNA boyası ile floresan mikroskop altında belirlenmiştir. Mevcut çalışmada folikül çapının sığır oositlerinin in vitro nükleer olgunlaşması üzerine etkisinin küçük foliküllerden elde edilen oositlerde MII safhasına ulaşmış oositlerin oranı, orta ve büyük foliküllerden elde edilenlerinden önemli oranda daha düşük olduğu tespit edilmiştir. İn vitro olgunlaştırma medyumuna 10,0 µg/ml FSH eklenmesinin oositlerin nükleer olgunlaşmadaki başarı oranını 0,5 ve 1,0 µg/ml’ye göre artırdığı saptanmıştır. Ayrıca yüksek FSH konsantrasyonunun nükleer olgunlaşmadaki iyileştirici etkisi, küçük foliküllerden elde edilen oositlerde daha fazla gözlemlenmiştir. Mevcut çalışmanın sonuçları 3–8 mm çapındaki foliküllerden elde edilen oositlerin daha başarılı bir olgunlaşma sergiledikleri, buna karşın küçük foliküllerden elde edilen oositlerin yüksek FSH konsantrasyonunda oransal olarak daha yüksek olgunlaşma başarıları sergileri saptanmıştır.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 3(7): 510-514, 2015

Effect of Follicle Size and Follicle Stimulating Hormone Concentration on Nuclear Maturation of Bovine Oocytes In Vitro

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 February 2015
Accepted 25 March 2015
Available online, ISSN: 2148-127X

Keywords:
Oocyte
Follicle size
FSH
In vitro maturation
Bovine

^{*} Corresponding Author:
E-mail: ugur.sen@ahievran.edu.tr

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the effect of follicle size and follicle stimulating hormone (FSH) concentration on nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. Follicles on bovine ovary were classified into 3 groups according to the diameter; small (<3 mm), medium (3–8 mm) and large (9–12 mm). Oocytes were aspirated from follicles with different size and matured in tissue culture medium (TCM–199) supplemented with 10% FCS and various concentrations of FSH (0.5, 1.0 or 10 µg/ml) for 22 hours filled with approximately 95% humidified and 5% CO₂ in air at 38.5 °C. At the end of culture period, nuclear maturation (at metaphase II; MII) of oocytes were determined by Bisbenzimid (Hoechst 33258) DNA staining under fluorescent microscope. In the present study, effect of follicle size on nuclear maturation of bovine oocytes were determined and the percentage of oocytes reached to M II stage was significantly lower in oocytes obtained small follicle than those of medium and large follicles. Supplementation of 10.0 µg/ml FSH into maturation media increased percentage of nuclear maturation compare to 0.5 and 1.0 µg/ml. Additionally, improving effect of high FSH concentration on nuclear maturation were more observed in oocytes obtained small follicles. The results of present study showed that oocytes from follicles with 3–8 mm diameters exhibited a more successful maturation, but oocytes obtained small follicles exhibited more maturation as a ratio under high FSH concentration.

Giriş

İn vitro kültür ortamlarında olgunlaştırmaya alınan sığır oositlerinin nükleer gelişimleri, oositlerin içerisinde buldukları foliküllerden çıkarıldıktan sonra doğal olarak kendiliğinden gerçekleşebilmektedir (Lonergan ve ark., 1994). Oositlerin in vitro şartlarda doğal bir süreç içerisinde kendiliğinden olgunlaşmaları elde edilen oositlerin in vitro embriyo üretiminde kullanımını kolaylaştırmaktadır (Sirard ve ark., 2007). Ancak in vivo olgunlaşmış oositlerin, in vitro şartlarda olgunlaştırılan oositlere göre ileriki gelişim potansiyeli bakımından farklılıklara sahip olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Lonergan ve ark., 1994; Sirard ve Blondin 1996). Tüm iyileştirmelere rağmen in vitro olgunlaştırılan oositlerin fertilizasyon sonrasındaki gelişim kapasiteleri in vivo olgunlaşanlara göre daha sınırlı olduğu gözlemlenmiştir (Lonergan ve ark., 1994). Bu durumun in vivo şartlarda foliküler büyüme esnasında oositte gerçekleşen önemli moleküler değişimlerin in vitro şartlarda tam olarak gerçekleşemediğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Dieleman ve ark., 2002). Bu sebeple oositlerin gelecekteki gelişim yetkinliği folikül gelişimi ile birlikte artmaktadır (Machatkova ve ark., 2004). Dolayısıyla in vitro süreçlerde oositlerin in vitro olgunlaşmadaki başarısını ve ileriki gelişim potansiyelini iyileştirmek için içerisinde buldukları foliküllerin büyüklüğü dikkate alınması gereken bir parametredir (Sirard, 2001).

İn vitro şartlarda oositleri olgunlaşma yetkinliğinin kazandırılmasında FSH önemli rol oynamaktadır (Sirard ve ark., 2007). FSH'nın in vitro oosit olgunlaşması üzerine olan etkileri tam olarak anlaşılmış olmasa da, yapılan birçok çalışma in vitro olgunlaştırma medyumlarına eklenen FSH'nın oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin genişlemesini arttırıp oositin mayotik (nükleer) ve sitoplazmik olgunlaşmasını tamamlanmasında önemli etkilerinin olduğunu bildirmiştir (Izadyar ve ark., 1998; Younis ve ark., 1989; Ocana ve ark., 1994; Macun ve Kaymaz, 2006; Sirard ve ark., 2007). Çünkü FSH reseptörleri kumulus ve granuloza hücrelerinde bulunması nedeniyle FSH'nın oosit olgunlaşması üzerine düzenleyici etkisi kumulus hücreleri aracılığı ile gerçekleşmektedir (Gordon, 2003). Ayrıca in vitro olgunlaştırmada kullanılan FSH'nın olgunlaşma sonrasında fertilizasyon oranında artışa ve erken embriyonik gelişimde iyileşmeye neden olduğu bildirilmektedir (Izadyar ve ark., 1998). Bu sebeplerden dolayı FSH, in vitro olgunlaştırma protokollerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İn vitro olgunlaştırmada kullanılan FSH konsantrasyonunun oositlerin olgunlaşma oranını etkilemekle birlikte aşırı ve yetersiz konsantrasyonları oosit olgunlaşmasını olumsuz etkileyebilmektedir (Choi ve ark., 2001; Çevik ve ark., 2011).

Folikül büyüklüğünün veya FSH kullanımının oositlerin in vitro olgunlaşmasını etkilediği bilinmesine rağmen bu iki faktörün birlikte sığır oositlerinin in vitro olgunlaşması üzerine olabilecek etkileri değerlendirilmemiştir. Dolayısıyla bu çalışma farklı büyüklüklerdeki foliküllerden elde edilen sığır oositlerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki FSH'nın sığır oositlerinin in vitro nükleer olgunlaşması üzerine olabilecek etkilerinin araştırılmasını amaçlamaktadır.

Materyal ve Metot

Çalışmada, mezbahada kesilen değişik yaş, ırk ve fizyolojik statüdeki sığırlardan elde edilen ovaryumlar, 30–35°C deki 0,1 µl/ml gentamisin sülfat ilave edilen %0,9'luk serum fizyolojik içerisinde kesimden en fazla 3 saat sonra laboratuvara ulaştırılmıştır. Ovaryumlar üzerindeki foliküller dijital kumpas yardımıyla ölçülerek, küçük (<3 mm), orta(3–8 mm) ve büyük (9–12 mm) olmak üzere üç gruba ayrılmışlardır. Gruplandırılan foliküller ayrı ayrı 10 ml'lik şırıngaların içerisine 18 g'lık iğne kullanılarak aspire edilmiştir. Aspirasyon işleminden sonra oositlerin de içerisinde bulunduğu folikül içi sıvı 60 mm çapındaki kültür kabına aktarılmış ve oositler stereo mikroskop altında 10× büyütmede seçilmişlerdir. Seçilen oositler, %1 antibiyotik antimikotik solüsyon eklenmiş (Sigma, A5955; 10000 IU penisilin, 100 mg streptomisin ve 25 µg amfoterisin B / ml) hepes tamponlu doku kültür medyumunda (H-TCM–199; Sigma, M7528) 2 defa yıkanmışlardır. Bunu takiben etrafında yeterli kumulus hücre kitlesi bulunan ve homojen sitoplazmaya sahip oositler in vitro olgunlaştırmaya alınmışlardır. Olgunlaştırma medyumuna bikarbonat tamponlu doku kültür medyumuna (TCM–199; Sigma, M4530) %10 fetal buzağı serumu, 27,5 µg/ml sodyum piruvat ve %1 antibiyotik antimikotik solüsyon ilave edilmesiyle hazırlanmıştır (Çevik ve ark., 2011). Hazırlanan olgunlaştırma medyumuna 0,5; 1,1 veya 10,0 µg/ml FSH eklenerek kullanma medyumuna hazırlanmıştır. İn vitro olgunlaştırmaya alınacak oositler önce 2 defa FSH içermeyen olgunlaştırma medyumunda yıkanmışlardır. Daha sonra oositler her bir kuyusunda üzeri mineral yağ ile kaplanmış farklı konsantrasyonlarda FSH içeren 500 µl olgunlaştırma medyumuna bulunduran 4 kuyulu kültür kabına her bir kuyusunda yaklaşık 30–40 adet oosit olacak şekilde aktarılmıştır. Kültür kabına aktarılan oositler 38,5°C'de, %5 CO₂ ve yaklaşık %95 oranında nem içeren ortamda 22 saat in vitro olgunlaştırmaya bırakılmıştır.

Olgunlaşma süresi sonunda farklı büyüklüklerdeki foliküllerden elde edilen ve farklı konsantrasyonlarda FSH ile muamele edilen oositler, 2 defa H-TCM–199'da yıkandıktan sonra 1,5 ml'lik ependorf tüplerin içerisine alınıp etrafını saran kumulus hücrelerinden ayırmak için 5 dakika vortekslenmişlerdir. Kumulus hücrelerinden ayrılan ve çıplak kalan oositler 1/3 oranında asetik asit: etanol karışımı içerisinde + 4°C'de 24 saat bekletilerek nükleer safhaları sabitlenmiştir. Daha sonra oositler gliserol ile 1/9 oranında karıştırılmış flüoresan bis-benzimide (Hoechst 33342) DNA boyasında 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmışlardır. Her bir deneme grubundaki oositin nükleer safhası 40x büyütmede floresan mikroskop altında (UV filtreli) incelenip, mayozun germinal vezikül, germinal vezikül yıkılması, metafaz I, anafaz I, telofaz I ve metafaz II aşamaları değerlendirilmiştir. Metafaz II safhasında olan oositler nükleer olarak olgunlaşmış oositler olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler Khi-kare yöntemiyle Minitab (1998) paket programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular

Çalışmada kullanılmak üzere mezbahaneye kesim için getirilen 47 baş sığırdan elde edilen toplam 94 adet ovaryum laboratuvara getirilmiştir. Bunlardan 7 tanesi foliküler ve lüteal kistli yapılar içerdiğinden veya oosit elde etmek için uygun foliküler yapıya sahip olmadığından deneme dışı bırakılmış olup, çalışmada toplam 87 adet sığır ovaryumu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan ovaryumlar üzerindeki küçük foliküllerden (<3 mm) 128 adet, orta büyüklükteki (3–8 mm) foliküllerden 168 adet ve büyük foliküllerden (9–12 mm) 148 olmak üzere toplam 444 adet oosit elde edilmiş olup ovaryum başına ortalama 5,1 adet oosit düşmektedir.

Sığır oositlerinin nükleer olgunlaşmaları (MII) üzerine folikül çapı ve FSH konsantrasyonunun etkisi Tablo 1’de sunulmuştur. Mevcut çalışmada folikül çapının sığır oositlerin in vitro nükleer olgunlaşması üzerine etkisi tespit edilmiş olup küçük foliküllerden elde edilen oositlerde MII safhasına ulaşmış oositlerin oranı, orta ve büyük foliküllerden elde edilenlerinkinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir (P<0,05). Genel olarak küçük foliküllerden elde edilen oositlerin %46,1’i MII safhasına ulaşırken orta ve büyük foliküllerden elde edilen oositlerin sırasıyla %67,3 ve %62,8’i MII safhasına ulaşmıştır (P<0,05). Çalışmada farklı düzeylerdeki FSH uygulamasının farklı çaplardaki foliküllerden elde edilen oositlerin nükleer olgunlaşma oranını etkilediği tespit edilmiş olup en yüksek olgunlaşma oranı in vitro olgunlaştırma medyumuna 10,0 µg/ml FSH eklendiğinde gözlemlenmiştir (P<0,05).

Folikül çapı ve FSH konsantrasyonunun sığır oositlerinin diğer nükleer safhaları (GV, GVY, MI) üzerine etkisi Tablo 2’de sunulmuştur. Mevcut çalışmada MII safhasına ulaşmamış, nükleer olgunlaşmasını tamamlayamayan ve mayoz bölünmenin germinal vezikül (GV), germinal vezikül yıkılması (GVY) ve metafaz I (MI, anafaz I ve telofaz I dahil) safhalarında bulunan oositlerin oranı birleştirilerek sunulmuş ve bu oositler in vitro olgunlaşmamış oositler olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada in vitro olgunlaşma kültürü sonunda nükleer olgunlaşmasını tamamlayamayan olgunlaşmamış oositlerin oranı küçük foliküllerden elde edilen oositlerde

orta ve büyük foliküllerden elde edilenlerinkinden daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir (P<0,05). Genel olarak küçük foliküllerden elde edilen oositlerin %53,9’u olgunlaşmadığı, orta ve büyük foliküllerden elde edilen oositlerin sırasıyla %32,7’si ve %37,2’sinin in vitro olgunlaşmadığı saptanmıştır (P<0,05).

Olgunlaştırma medyumuna 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml ve 10,0 µg/ml FSH eklenen foliküllerde olgunlaşmış oosit oranı küçük foliküllerde sırasıyla, %37,2 %41,5 ve %59,1; orta foliküllerde sırasıyla, %62,3; %64,4 ve %75; büyük foliküllerde sırasıyla, %59,6; %60,8 ve %70,8 olarak (P<0,05) belirlenmiştir (Tablo 1). Olgunlaştırma medyumuna 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml ve 10,0 µg/ml FSH eklenen foliküllerde olgunlaşmamış oosit oranı küçük foliküllerde sırasıyla, %62,8; %58,5 ve %40,8; orta foliküllerde sırasıyla, %37,7; %35,6 ve %25; büyük foliküllerde sırasıyla, %40,4; %39,2 ve %29,2 olarak (P<0,05) belirlenmiştir (Tablo 2).

Çalışmada in vitro olgunlaştırma medyumundaki FSH konsantrasyonunun artırılmasının olgunlaşmamış oosit oranını düşürdüğü saptanmış olup bu etki en fazla küçük foliküllerden elde edilmiş oositlerde gözlemlenmiştir. Olgunlaştırma medyumuna 10,0 µg/ml FSH eklenen küçük foliküllerde olgunlaşmamış oosit oranı, 0,5 µg/ml ve 1,0 µg/ml FSH eklenenlerden sırasıyla %22,0 ve %17,7 daha düşük, orta foliküllerden elde edilenlerin sırasıyla %12,7 ve %10,6 daha düşük ve büyük foliküllerden elde edilenlerde sırasıyla %11,2 ve %10,0 daha düşük oranda olgunlaşmamış oosit olduğu tespit edilmiştir (P<0,05).

Farklı büyüklüklerdeki foliküllerden elde edilen oositlere uygulanan farklı FSH konsantrasyonları arasındaki nükleer olgunlaşma oranı farkları Şekil 1’de sunulmuştur. In vitro olgunlaştırma medyumuna 10,0 µg/ml FSH eklenmesinin en yüksek orandaki etkisi küçük foliküllerden elde edilen oositlerde gözlemlenmiştir. Olgunlaştırma medyumuna 10,0 µg/ml FSH eklenen küçük foliküllerden elde edilen oositler 0,5 µg/ml ve 1,0 µg/ml FSH eklenenlerden sırasıyla %21,9 ve %17,9 daha yüksek oranda, orta foliküllerden elde edilenlerin sırasıyla %12,7 ve %11,6 daha yüksek oranda ve büyük foliküllerden sırasıyla %11,2 ve %10,0 daha yüksek oranda MII safhasına ulaştıkları tespit edilmiştir (P<0,05).

Tablo 1 Sığır oositlerinin nükleer olgunlaşmaları (MII) üzerine folikül çapı ve FSH konsantrasyonunun etkisi.

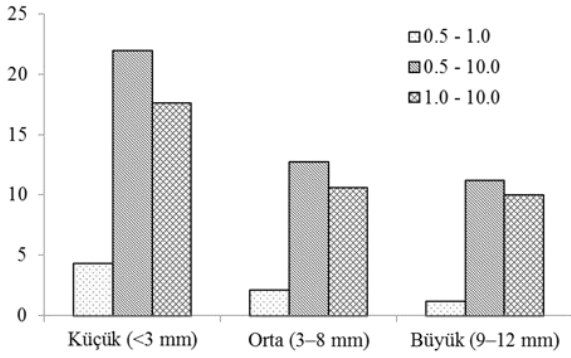
FSH (µg/ml)	Farklı çaplardaki foliküllerden elde edilen oositler		
	Küçük (<3 mm) MII Oosit sayısı (%)	Orta (3–8 mm) MII Oosit sayısı (%)	Büyük (9–12 mm) MII Oosit sayısı (%)
0,5	16 (37,2) ^{Bb}	33 (62,3) ^{Ba}	28 (59,6) ^{Ba}
1,0	17 (41,5) ^{ABb}	38 (64,4) ^{Ba}	31 (60,8) ^{Ba}
10,0	26 (59,1) ^{Ab}	42 (75,0) ^{Aa}	34 (70,8) ^{Aa}

^{a,b}Aynı satırda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0,05), ^{A,B}Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0,05), M II = metafaz II.

Tablo 2 Folikül çapı ve FSH konsantrasyonunun sığır oositlerinin diğer nükleer safhaları (GV, GVY, MI) üzerine etkisi.

FSH (µg/ml)	Farklı çaplardaki foliküllerden elde edilen oositler		
	Küçük (<3 mm) GV, GVY, MI Oosit sayısı (%)	Orta (3–8 mm) GV, GVY, MI Oosit sayısı (%)	Büyük (9–12 mm) GV, GVY, MI Oosit sayısı (%)
0,5	27 (62,8) ^{Aa}	20 (37,7) ^{Ab}	21 (40,4) ^{Ab}
1,0	24 (58,5) ^{ABa}	21 (35,6) ^{Ab}	20 (39,2) ^{Ab}
10	18 (40,8) ^{Ba}	14 (25,0) ^{Bb}	14 (29,2) ^{Bb}

^{a,b}Aynı satırda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0,05), ^{A,B}Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0,05), GV = germinal vezikül; GVY = germinal vezikül yıkılması; M I = metafaz I (anafaz I ve telofaz I dahil).



Şekil 1 Farklı büyüklüklerdeki (küçük; <3 mm, orta; 3-8 mm ve büyük 9-12 mm) foliküllerden elde edilen oositlere uygulanan farklı FSH konsantrasyonları (0,5; 1,0 ve 10,0 µg/ml) arasındaki nükleer olgunlaşma oranı farkları. ^{a,b; x,y; α,β} P<0,05.

Tartışma

Oositlerin in vitro olgunlaşma ve fertilizasyon sonrasındaki embriyonik gelişim evrelerindeki başarısı folikül büyüklüğü ile ilişkilendirilmesine rağmen tek başına folikül büyüklüğü, oositin kaliteli bir embriyo haline gelmesi için yeterli bir ölçüt değildir (Camargo ve ark., 2006). Yapılan çalışmalar ovaryum üzerindeki folikül çapı büyüdükçe içerisinde bulunan oositlerin sitoplazmik ve nükleer olgunlaşmalarını tamamlama yeteneklerini arttırdığını göstermiştir (Lonergan ve ark., 1994; Ocana ve ark., 1999; Sirard ve Blondin, 1996). Ayrıca, sığır in vitro kültür sistemlerinde oositlerin blastosist safhasına kadar devam edebilmesi için buldukları foliküllerin çapının 2 mm'den büyük olması gerektiği bildirilmiştir (Yang ve ark., 1998). Çünkü ovaryum üzerinde çapı 2 mm'den küçük foliküllerin oosit gelişimi için gerekli mikro çevre şartları henüz tam olarak oluşmadığından bu foliküllerden elde edilen oositlerin in vitro olgunlaşma yetenekleri çok düşük olmaktadır (Yang ve ark., 1998). Dahası Camargo ve ark. (2006) büyüme sürecinde olan küçük çaplı foliküllerden alınan oositlerin olgunlaşma yeteneğinin düşük olmasının, oositin olgunlaşması için gerekli olan RNA sentezinin yeteri düzeyde gerçekleşmemesinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

İn vivo oosit gelişimi üzerine FSH'nın etkili olduğu bilinmekte ve bu sebeple in vitro oosit olgunlaştırma medyumlarında FSH yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Sirard ve ark., 2007). FSH reseptörleri kumulus ve granuloza hücrelerinde bulunması nedeniyle FSH'nın oosit olgunlaşması üzerine düzenleyici etkisi kumulus hücrelerinin varlığına bağlıdır (Gordon, 2003). İn vitro olgunlaştırma medyumuna FSH ilavesi, kumulus hücrelerinde protein kinase A (cAMP) aktivitesini uyarmakta ve kumulus genişlemesi meydana gelerek oositin hem sitoplazmik hem de nükleer olgunlaşması desteklenmektedir (Izadyar ve ark., 1998). FSH'nın oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin genişlemesini artırıp oosit olgunlaşmasını desteklemesinin yanında fertilizasyon sonrası pronükleus oluşumunu ve erken embriyonik dönemdeki gelişimi desteklediği bildirilmiştir (Izadyar ve ark., 1998; Younis ve ark., 1989). Yukarıdaki bildirimler sığır oositlerinin in vitro olgunlaşmasında hem folikül büyüklüğünün hem de FSH'nın etkili olabileceğini göstermektedir. Ancak sığır oositlerinin in vitro

olgunlaşması üzerine her ikisinin ortak etkisi pek fazla dikkate alınmamıştır. Dolayısıyla mevcut çalışma farklı büyüklüklerdeki foliküllerden elde edilen sığır oositlerine uygulanan farklı FSH konsantrasyonunun sığır oositlerinin nükleer olgunlaşması üzerine etkilerini belirlemek amacıyla dizayn edilmiştir.

Mevcut çalışmada 3 mm den küçük foliküllerden elde edilen oositlerin in vitro olgunlaşma başarısının düşük olduğu tespit edilmiş olup 3 mm'den büyük çaptaki foliküllerden elde edilen oositlerden MII safhasına ulaşanların oranı daha yüksek olup daha başarılı olgunlaşma sergiledikleri saptanmıştır. Benzer olarak, Lonergan ve ark. (1994) 3 mm'den büyük ve 10 mm'den küçük foliküllerden elde edilen oositlerin daha yüksek oranda in vitro olgunlaşma sergilediklerini bildirmişlerdir. Yang ve ark. (1998) 1-2 mm'lik foliküllerden elde edilen oositlerin %58'inin, 3-5 mm'lik foliküllerden elde edilen oositlerin %75'inin ve 6-8 mm'lik foliküllerden elde edilen oositlerin %84'ünün in vitro olgunlaşmada başarılı olduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlar mevcut çalışmamızın sonuçları ile uyum göstermiş olup en yüksek in vitro olgunlaşma oranı 3-8 mm çapındaki foliküllerden elde edilen oositlerde gözlemlenmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalar küçük (2-5 mm) foliküllerden toplanan oositlerin, büyük (10 mm küçük) foliküllerden toplanan oositlere göre fertilizasyon ve blastosist safhasına ulaşma oranlarının daha düşük olduğunu göstermiştir (Blondin ve ark., 1997; Kubota ve Yang, 1998). Dahası, Van Soom ve de Kruij, (1996) 6 mm'den, Sirard ve Blondin (1996) 8 mm'den büyük foliküllerden elde edilen oositlerin daha küçük foliküllerden elde edilenlere göre olgunlaşma ve embriyonik gelişimde daha başarılı olduğunu tespit etmişlerdir.

Gordon (2003) ovaryum üzerindeki folikülün büyüdükçe ATP sentezini arttırdığını ve bu durumun içerisinde bulunan oositin gelişmesi ve olgunlaşması için gerekli enerji ihtiyacını karşıladığını bildirmiştir. Ayrıca, Gordon (2003) folikül büyüklüğü 8 mm çapına ulaştığında oositlerin normal büyüklüklerinin %80'ine ulaştıklarını ve gelişimlerinin büyük bir kısmını tamamladıklarını bildirmiştir. Mevcut çalışmada farklı çaplardaki foliküllerden elde edilen oositlerin nükleer olgunlaşma oranları karşılaştırıldığında en düşük olgunlaşma başarısı 3 mm'den küçük çaptaki foliküllerden elde edilen oositlerde gözlemlenirken diğer iki grupta gözlemlenen olgunlaşma sonuçları birbirine benzer bulunmuştur. Bu durum yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçları ile uyum göstermektedir. Ancak in vitro embriyo üretiminde in vitro olgunlaşmadaki başarı önemli olmakla birlikte, gerçek anlamda olgunlaşmanın ortaya konması fertilizasyon başarısı ve erkek pronükleusu geliştirebilme yeteneği ile ilişkilidir. Bu nedenle, anılan büyüklüklerdeki foliküllerden elde edilen oositlerin olgunlaşmalarının incelenmesinde M II safhasına ulaşma veya nükleer olgunlaşmayı tamamlama gibi kriterler tek başlarına yeterli görünmese de, 3-8 mm çapındaki foliküllerden elde edilen oositlerin sığır in vitro embriyo üretimi çalışmalarında kullanılmak üzere iyi bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada in vitro olgunlaştırma medyumuna eklenen FSH konsantrasyonundaki artışın, sığır oositlerinin in vitro nükleer olgunlaşmasındaki başarısını (M II safhasına ulaşma oranı) arttırdığı ve başarı

oranındaki en yüksek artışın 3 mm'den küçük foliküllerden elde edilen oositlerde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Küçük foliküllerden elde edilen oositlerin yüksek konsantrasyonda (10,0 µg/ml) FSH ile muamelesi oransal olarak diğer foliküllerden elde edilen oositlere göre M II safhasına ulaşma oranını önemli derecede arttırmıştır. Xu ve ark. (1986) 1–3 mm çapındaki foliküllerden elde edilen oositlerde protein sentez yeteneğinin iyi olmasına rağmen cAMP aktivitesinin henüz mayoz bölünmeyi destekleyecek RNA duyarlılığına sahip olmadığından bu oositlerde mayoz bölünme yeteneğinin düşük olduğunu bildirmişlerdir. Mehlmann (2005) ve Sirard ve ark. (2007) ise FSH'nın oositin mayoz bölünmesi ile ilişkili olan cAMP aktivitesini ve sentezini desteklediğini bildirmiştir. Mevcut çalışmada yüksek konsantrasyonda FSH ile muamele edilen küçük foliküllerden elde edilen oositlerin in vitro olgunlaşma oranı diğer foliküllerden elde edilenlere göre beklenenin altında kalsa da yüksek FSH konsantrasyonunun M II safhasına ulaşma oranı üzerine iyileştirici etkisi bu oositlerde daha fazla gözlemlenmiştir. Bu durum küçük foliküllerden elde edilen oositlere yüksek konsantrasyonda FSH uygulanmasının yukarıda bahsedilen cAMP aktivitesini diğer foliküllerden elde edilenlere göre daha fazla etkilediğini ve bu oositlerin mayoz bölünmesini daha fazla desteklediğini gösterebilir. Dolayısıyla sığır in vitro embriyo sistemlerinde 3 mm'den küçük foliküllerden elde edilecek oositler kullanılacak ise bu oositlere in vitro olgunlaştırmada yüksek konsantrasyonda (10,0 µg/ml) FSH uygulaması yapılamamasının in vitro nükleer olgunlaşmadaki başarı oranını ve ilerideki başarısını arttırabileceği söylenebilir.

Sonuç olarak mevcut çalışmada folikül büyüklüğü ve FSH konsantrasyonunun oosit olgunlaşması üzerine etkisi bir kez daha teyit edilmiş olsa da 3 mm'den küçük foliküllerden elde edilen oositlere yüksek konsantrasyonda FSH uygulamasının oositlerin MII safhasına ulaşma oranında iyileştirmeye neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca in vitro şartların in vivo şartlara göre oosit olgunlaşması üzerindeki düşük yetkinliği kültür ortamına eklenen FSH konsantrasyonundaki artış ile iyileştirilebilir. Mevcut çalışmanın sonuçları 3 mm'den küçük foliküllerden elde edilen oositlerin nükleer olgunlaşmalarının yüksek FSH konsantrasyonu ile iyileştirilebildiğini gösterse de bu oositlerin in vitro fertilizasyon sonrasındaki embriyonik gelişimlerinin de incelenmesi üzerine çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Kaynaklar

Blondin P, Guilbalt LA, Sirard MA. 1997. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*, 48: 803–813.

Camargo LSA, Viana JHM, Sa WF, Ferreira AM, Ramos AA, Vale Filho VR. 2006. Factors influencing in vitro embryo production. *Anim. Reprod.*, 3: 19–28.

Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE Jr, Squire EL. 2001. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*, 56: 661–670.

Çevik M, Şen U, Koçyiğit A, Soydan E, Kuran M. 2011. Effects of serum, gonadotropins, epidermal growth factor and estradiol 17-beta on cumulus expansion and nuclear maturation of bovine oocytes. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 17: 1009–1014.

Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL. 2002. Effects of in vivo pre-maturation and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, 57: 5–20.

Gordon I. 2003. Laboratory production of cattle embryos, 2nd edition, CABI Publishing, Wallingford.

Izadyar F, Zeinstra E, Bevers MM. 1998. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 51: 339–345.

Kubota C, Yang X. 1998. Cytoplasmic incompetence results in poor development of bovine oocytes from small follicles. *Theriogenology*, 49: 183.

Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocytes quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, 37: 48–53.

Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*, 61: 329–335.

Macun HC, Kaymaz M. 2006. Sığır oositlerinin in vitro maturasyonuna follikül uyarıcı hormon ve insan menopozal gonadotropininin etkisi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 53: 25–29.

Mehlmann LM. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocytes maturation. *Reproduction*, 130:791–799.

Ocana QJM., Pinedo MM, Moreno MM. 1999. Influence of follicle size, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 51: 667–672.

Ocana QJM, Millan MM, Cordoba MV, Franganillo AR. 1994. The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 41: 405–411.

Sirard MA, Blondin P. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 417–426.

Sirard MA, Desrosier S, Assidi M. 2007. In vivo and in vitro effects of FSH on oocytes maturation and developmental competence. *Theriogenology*, 68: 71–76.

Sirard MA. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progress and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, 55: 1241–1254.

Van Soom A, de Kruif A. 1996. Oocytes maturation, sperm capacitation and pre-implantation development in the bovine: Implications for in vitro production of embryos. *Reprod. Dom. Anim.*, 31: 687–701.

Xu KP, Greve T, Smith S, Hyttel P. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocytes maturation in vitro. *Acta Vet. Scand.*, 27: 505–519.

Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PEJ, Presicce GA. 1998. Control of oocytes maturation is cows–biological factors. *Theriogenology*, 49: 471–482.

Younis AI, Brackett BG, Fayrer, HRA. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.*, 23: 189–201.