

## ÖSTRUSTAKİ İNEK SERUMU VE FÖTAL BUZAĞI SERUMUNUN İN VİTRO EMBRİYO ELDE EDİLMESİNE ETKİSİ

(The Effect of Estrous Cow Serum and Fetal Calf Serum on In vitro Embryo Production)

Numan AKYOL<sup>1</sup>

Nesrin SULU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü  
<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

### ÖZET

Bu çalışmada, in vitro maturasyon mediumuna eklenen Östrustaki İnek Serumuna (ECS) ve Fötal Buzağı Serumunun (FCS) in vitro embriyo elde edilmesine etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, morfolojik sınıflandırmaya göre A ve B kalite inek oositleri kullanılmıştır. Maturasyon mediumlarına, %5, %10 ve %20 oranlarında ECS; kontrol grubunda ise aynı oranlarda FCS ilave edilmiş ve embriyolar morula-blastosist evresine kadar kültüre edilmiştir. Veriler çift yönlü varyans analizi kullanılarak test edilmiştir. Çalışmada, ECS serum ekleme oranlarına göre sırasıyla; 0.12±0.023, 0.15±0.023 ve 0.15±0.020; FCS'de ise 0.17±0.036, 0.24±0.045 ve 0.19±0.025 morula-blastosiste ulaşma oranı elde edilmiştir.

Sonuç olarak, Fötal Buzağı Serumunun (FCS), in vitro morula-blastosist elde etmede Östrustaki İnek Serumuna (ECS) göre daha üstün olduğu görülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** İn vitro, Oosit, ECS, FCS, Morula, Blastosist

### SUMMARY

The aim of this study was to compare influence of estrous cow sera (ECS) and fetal calf sera (FCS) on in vitro embryo production. Oocytes were selected and used as morphologically A and B quality grade in this study. Estrous Cow Serum was added in the maturation media 5%, 10% and 20%. The same proportions of FCS were added in the control groups. Embryos were cultured up to morula-blastocyst stage. Data were tested by two way ANOVA. The proportion of coming into morulae-blastocyst stage were 0.12±0.023, 0.15±0.023, 0.15±0.020 for ECS and 0.17±0.036, 0.24±0.045, 0.19±0.025 for FCS for 5%, 10% and 20% levels, respectively.

As a result, the effect of fetal calf sera (FCS) was superior than estrous cow sera (ECS) for in vitro development into morulae-blastocyst stage of bovine oocytes.

**Key words:** In vitro, Oocyte, ECS, FCS, Morulae, Blastocyst

### GİRİŞ

Dünyada ilk kez in vitro koşullarda üretilen memeli yavru, 1959 yılında Chang tarafından tavşanlardan elde edilmiştir. Bundan tam 23 yıl sonra ise Brackett ve arkadaşları tarafından ilk buzağı bu yöntemle alınmıştır (12). İlerleyen yıllarda, ovaryum fizyolojisi ve fertilizasyonla ilgili sınırların aydınlatılması ile birlikte in vitro embriyo üretimi alanında önemli gelişmeler yaşanmıştır.

Türkiye'de in vitro fertilizasyon konusunda ilk çalışmalar tavşanlar üzerinde 1984 yılında başlamış (23) ve ilk in vitro üretim kuzular 2001 yılında elde edilmiştir (3). İnek ovaryumlarında, primordial folliküller içerisinde, çapı 30µm ve sayısı bir veya iki milyon olduğu tahmin edilen küçük oositler bulunmaktadır (17).

Bir inek normal koşullarda hayatı boyunca 7-8 yavru verebilmektedir. Dolayısıyla çok sınırlı bir kısmı ovulasyon şansı bulabilen oositleri kullanma şansı veren in vitro fertilizasyon tekniği sayesinde, üstün verimli bireylerden birim zamanda alınan yavru sayısını artırmak olasıdır. Günümüzde yardımcı üreme teknikleri olarak bilinen bu metotla embriyo üretimi çiftlik hayvanlarının ıslahında yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır (7). Ancak pek çok laboratuvarında, kullanılan metoda göre morula-blastosist elde etme oranı %25-40 arasında değişmektedir. İn vitro embriyo elde etme oranının düşük olması büyük oranda maturasyon sırasındaki olumsuzluklar veya kullanılan kültür mediumunun biyokimyasal yetersizliğinden

\* A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından 23.02.2004 tarihinde kabul edilen doktora çalışmasından özetlenmiştir (II. Bölüm).

kaynaklanmaktadır. Bu olumsuzlukları önlemek amacıyla maturasyon ortamına pek çok katkı yapılmaktadır. Çünkü, maturasyon ortamının kusursuz olması oositin yalnızca fertilizasyon yeteneğini değil aynı zamanda embriyonik gelişimini de etkilemektedir (2).

Serumlar, maturasyon ortamlarının önemli katkı maddelerindedir. Kültür ortamlarına eklenen serumlar, çeşitli kaynaklardan sağlanmakta ve oosit gelişimi üzerine farklı etkileri olmaktadır. Plasental östrojen içeren fetal buzağı serumu (FCS) veya ovaryum kaynaklı östrojen içeren östrustaki inek serumu (ECS) maturasyon ortamlarına eklenmekte, hem protein hem de östrojen kaynağı olarak tercih edilmektedir (6).

İn vitro fertilizasyon aşamasını tamamlayan oositler in vitro kültür (IVC) ortamlarına alınırlar. Yaygın olarak in vitro embriyo kültürü amacıyla farklı sistemler kullanılmaktadır (7).

Bunlar;

**1. İn vivo Embriyo Kültür Sistemleri:** Fertilize oosit taşıyıcı hayvanın ligatüre edilmiş oviduktuna yerleştirilir. İn vivo kültür amacıyla genellikle koyun ve tavşanlar seçilir. Transplantasyondan 4-5 gün sonra embriyolar

toplanır, taşıyıcı anneye nakledilir veya dondurulur (5,25).

**2. Ko-kültür içeren, IVC Sistemleri:** Ko-kültür amacıyla, ovidukt epitel hücreleri, granuloza hücreleri, rat karaciğer hücreleri veya uterus hücreleri kullanılır. Kültür vasatları içerisinde petri tabanına tabaka yapılacak tarzda yerleştirilirler ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 38.5°C'de inkube edilirler. Bunların içinde en başarılı olanı ovidukt epitel hücreleridir (10).

**3. Basit IVC Sistemleri:** Fertilize edilen oosit kumulus hücrelerinden uzaklaştırıldıktan sonra, somatik hücre desteği içermeyen basit IVC vasatlarında inkube edilirler. En yaygın olarak kullanılan vasat aminoasit ve serum ilave edilmiş sentetik ovidukt sıvısıdır (Synthetic oviductal fluid-SOF). Aminoasit katkılı Charles Rosenkrans (CR1aa) vasatı da başarıyla kullanılmaktadır (16). Pek çok laboratuvarında embriyo kültürü; 38-39°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95'in üzerinde nemli bileşimde veya %5 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub>, bileşimine sahip inkubasyon ortamında gerçekleştirilir (9). Günümüzde bazı laboratuvarlarda kullanılan basit IVC sistem örnekleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Bazı laboratuvarlarda uygulanan somatik hücre katkısız IVC sistemleri (18)

Kültür mediumu	Araştırmacı	Atmosferik durum	Serum katkısı
CR1aa	Rosenkrans ve First	%5 CO <sub>2</sub> , %95 hava	Yok
SOF	Fukui ve ark.	%5 CO <sub>2</sub> , %5 O <sub>2</sub> , %90 N <sub>2</sub>	FCS
SOF	Takahashi ve First	%5 CO <sub>2</sub> , %95 hava	BS
TCM-199	Nagao ve ark.	%5 CO <sub>2</sub> , %5 O <sub>2</sub> , %90 N <sub>2</sub>	Yok
TCM-199 + antioksidan*	Takahashi ve ark.	%5 CO <sub>2</sub> , %95 hava	FCS

\*Antioksidan: β-merkaptotanol

Yaygın olarak sığır embriyoları, kültür petripleri içerisindeki mikrodamlara yerleştirilerek üzerine embriyotoksik etkide olmayan sıvı parafin veya mineral yağ kapatılır. Mineral yağ, embriyo kültür mediumuyla kimyasal ilişkiye girmeyen, bileşik oluşturmayan ve ortamda erimeyen

yani kültür ortamının bileşimini bozmayan bir yapıdadır. Mineral yağın, medium pH'sının değişmez tutulması, mikroorganizma kontaminasyonunu ve buharlaşmayı önleme gibi önemli görevleri vardır (7, 9). IVC sistemlerinden SOF ve CR1aa bileşimleri Tablo 2'de görüldüğü gibidir.

**Tablo 2.** CR1aa ve SOF kültür mediumu bileşimleri (20)

Medium içeriği	CR1aa	SOF
NaCl	114.7 mM	107.7 mM
KCl	3.1 mM	7.16 mM
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	-	1.71 mM
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	-	0.49 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	1.19 mM
NaHCO <sub>3</sub>	26.2 mM	25.07 mM
Hemikalsiyum laktat	5.0 mM	60 µl*
Sodyum piruvat	0.4 mM	0.33 mM
Glukoz	-	1.5 mM
L-Glutamin	14.6 mg/dl	-
MEM** (X100)	1 ml/dl	-
BME*** (x50)	2 ml/dl	-
BSA	3 mg/ml	3 mg/ml
Fenol kırmızısı (% 0.5)	0.02 ml	0.02 ml

\* Sodyum tuzu kullanıldığında. \*\*Esansiyel olmayan aminoasit solusyonu \*\*\*Aminoasit solusyonu

Bu çalışmada, maturasyon vasatına değişik oranlarda ilave edilen östrustaki inek serumunun (ECS) ve fetal buzağı serumunun (FCS), in vitro koşullarda elde edilen embriyo oranına etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**Östrustaki İnek Serumu :** Serum kaynağı olarak, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Entitesinde barındırılan, düzenli kontrollerde herhangi bir hastalık taşımadığı belirlenen, bir yaşında, Holstein Fresian ırkı üç düve kullanılmıştır. Östrus göstermesi amacıyla düvelerde senkronizasyon yapılmamış, kendiliğinden östrus göstermeleri beklenmiştir. Östrus başlangıcından itibaren ilk 3 saat içerisinde vena jugularisten 10 ml'lik vakumlu tüplere (Venojekt-Terumo) kan alınmıştır. Vakumlu tüplerdeki kanlar önce 3000 rpm devirde, 10 dakika santrifüj edilerek yüzey serumu izole edilmiş ardından 1.5 ml'lik santrifüj tüplerinde, 14000 rpm devirde, 5 dakika tekrar santrifüj edilerek hemolize meydan vermeden serumlar ayrılmıştır. Serumlar daha sonra 56°C'de 30 dakika su banyosunda tutularak inaktivasyonları yapılmış ve her serumdan eşit miktarlarda alınarak stok serum bileşimi elde

edilmiştir. Stok serum bileşimi, kullanım zamanına kadar -22°C'de saklanmıştır (12).

**Ovaryum Toplanması :** Ankara iline ait Çubuk Belediye mezbahasında kesimi yapılan ineklerden toplanan 457 adet ovaryum kullanılmıştır. Ovaryumlar, hayvanların kesimini takip eden 15-20 dakika içerisinde taze taşıma solusyonu ile yıkanarak taşıma ortamına alınmıştır (11).

**Oosit Toplanması ve Değerlendirilmesi :** Folliküler aspirasyon amacıyla Schellander ve ark. (19)'nın uyguladığı şekilde, 2-7 mm arasında çapa sahip folliküllerden aspirasyon yapılmış, ardından Takagi ve ark. (21)'nin bidirdikleri şekilde, ovaryum dilimlenerek elde edilen oositler, yıkama vasatıyla yıkanarak 95 mm'lik altı çizili petrilere alınmıştır. Oosit seçimi ise Brackett ve Zuelke'nin (4) yöntemine göre yapıldı. Bu amaçla stereo mikroskop altında, kumulus oosit kompleksine (COC) sahip, ooplazması homojen görümlü oositler içerisinde A ve B kalitede olanlar in vitro maturasyon amacıyla seçilmiştir.

**Oositlerin İn vitro Maturasyonu :** Maturasyon vasatı olarak TCM-199 (M7528, Sigma-Aldrich Co.) kullanılmıştır. Maturasyon vasatına; 0.1 mg/ml L-Glutamin (G8540,

Sigma-Aldrich Co.), 100 IU/ml kristalize penisilin-G potasyum (İ.E. Ulugay) ve 100 µg/ml kristalize streptomisin sülfat (İ.E. Ulugay) eklenmiştir. Deneme gruplarına, önceden hazırlanan stok serumdan %5, %10 ve %20 oranlarında, kontrol grubuna ise aynı oranlarda FCS ( F2442, Sigma-Aldrich Co.) ilave edilmiş ve oositlerin in vitro maturasyon işlemi, % 5 CO<sub>2</sub>, % 95'in üzerinde bağıl nem ve 38.5°C'de, 22 saatte gerçekleştirilmiştir. 22 saat inkubasyon sonunda, stereo mikroskop altında kumulus ekspansiyonu görülenler mature kabul edilmiştir (21).

**Spermatozoa Hazırlanması ve İn vitro Kapasitasyonu** : İn vitro fertilizasyon amacıyla Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Suni Tohumlama Laboratuvarında üretilen ve içerisinde 175x10<sup>5</sup>

spermatozoa bulunan 0.25 ml'lik ticari payetlerde dondurulmuş Holstein Fresian ırkı boğa spermaları kullanılmıştır. İn vitro fertilizasyonda farklılığa meydan vermemek amacıyla, bir boğadan, aynı gün alınarak dondurulan, eşdeğer motiliteye sahip spermalardan; kapasitasyon amacıyla Brackett ve Oliphant mediumundan yararlanılmıştır (Tablo 3). Kapasitasyon işlemleri ve uygun spermatozoa yoğunluğunun elde edilmesi amacıyla, Kanagawa ve ark. (12)'nin önerdiği yöntemle göre fertilizasyon vasatı hazırlanmış ardından spermatozoonlar, fertilizasyon mikrodamlarına (95 µl) alınarak inkubatöre yerleştirilmiştir. Oositler, Oosit Yıkama Vasatı (OYV) ile yıkandıktan sonra toplam 30 dakika içerisinde bu mikrodamlara yerleştirilmiştir.

**Tablo 3.** Brackett ve Oliphant (BO) vasatının bileşimi ve hazırlanması (12).

Kimyasal	Miktar		BOM	SYV	OYV	SSV
NaCl	4.3092g	STOK 1	76 ml	50 ml BO	40 ml BO	10 ml BO
KCl	0.1974g					
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2171g					
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0840g					
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0697g					
%0.5 Fenol Kırmızısı	0.1 ml					
Saf Su	500 ml	STOK 2	24 ml			
NaHCO <sub>3</sub>	2.5873g					
%0.5 Fenol Kırm.	0.04 ml					
Saf Su	200 ml					
	Na Piruvat		0.0138g			
	Penisilin		10.000U			
	Streptomisin		10mg			
	Kafein (Na tuzu)			0.1942g		
	Heparin (5000U/ml)			0.05ml		
	BSA				0.4g	
	BSA					0.2g

Brackett&Oliphant Mediumu bileşenleri  
 SYV (Sperm Yıkama Vasatı) bileşenleri  
 OYV (Oosit Yıkama Vasatı) bileşenleri  
 SSV (Sperm Sulandırma Vasatı) bileşenleri

**İN vitro Kültür** : Embriyo kültürü için CR1aa mediumu taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır. Medium içeriği ve hazırlanması ile ilgili ayrıntılar Tablo 4 ve 5'te verilmiştir (12).

İN vitro fertilizasyonun ardından oositlerin etrafını saran kumulus hücreleri

pipetleme işlemiyle uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla, steril cam Pastör pipetleri kullanılarak işlem en kısa sürede (10-15 dk) tamamlanmıştır (14). Kanagawa ve ark. (12)'nin yöntemine göre, oositler kültür ortamlarına alınmadan önce, kumulus hücreleri ve spermatozoonlardan arınmaları için en az 3

saat önceden hazırlanıp inkubatöre kaldırılmış petrielerin (Falcon-1008, Dickinson) değişik yerlerinde yıkanmıştır. İn vitro embriyo kültürü amacıyla %5 CO<sub>2</sub>, %95'in üzerinde bağıl nem ve 38.5°C merkezi sıcaklıktaki inkubatör kullanılmıştır. Embriyoları kültür sürecinde inkubasyona alınmasını takip eden 48. saatte bölünme kontrolleri yapılmıştır.

Partenogenetik bölünme kontrolünü yapmak üzere, her mezbaha çalışmasında mikrodamlardan rastgele alınan yaklaşık 20

oosit, fertilizasyon yeterliliğinde olmayan (birkaç kez dondurulup çözdürülürülerek öldürülmüş) spermatozoonlarla fertilizasyon sürecine alınmıştır. Fertilizasyon kontrolünde bölündüğü belirlenen oositler, partenogenetik bölünme olarak kaydedilmiştir (1).

Serum çeşidi ve katılım oranlarına göre, morula blastosiste ulaşma oranlarına ait ortalamaların karşılaştırılmasında iki yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

**Tablo 4.** Kültür vasatı (CR1aa) stok solüsyonlarının içeriği (12)

STOK 1*		STOK 2*	
Kimyasal	Miktar	Kimyasal	Miktar
NaCl	3.3515 g	Hemikalsiyum laktat	0.2998 g
KCl	0.1155 g		
Na Piruvat	0.0220 g		
NaHCO <sub>3</sub>	1.1005 g		
Fenol kırmızısı**	1 ml		
Saf su ile 380 ml'ye tamamlanır		Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır	

\*Stok solüsyonlar buzdolabında (+4°C), bir ay saklanabilir. \*\*%0.5 ana solüsyondan

**Tablo 5.** Kültür vasatının (CR1aa ) içeriği ve hazırlanması (12)

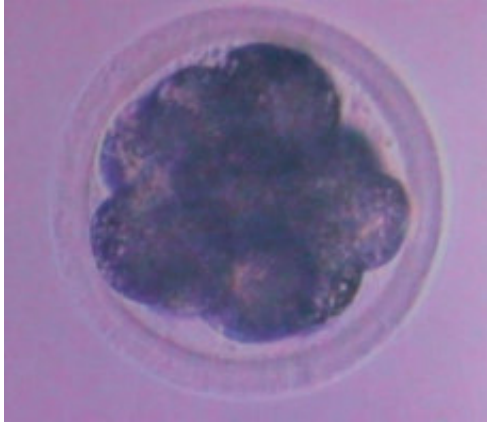
Vasat içeriği	Miktar
STOK 1	76 ml
STOK 2	20 ml
BME 50x (B6766, Sigma-Aldrich Co.)	2 ml
MEM 100x (M7145, Sigma-Aldrich Co.)	1 ml
L-Glutamin (20 mg/ml ana solüsyon)	1 ml
BSA (Fatty acid free)	0.3 g
FCS	5 ml
Penisilin	100 IU/ml
Streptomisin	100 µg/ml

## BULGULAR

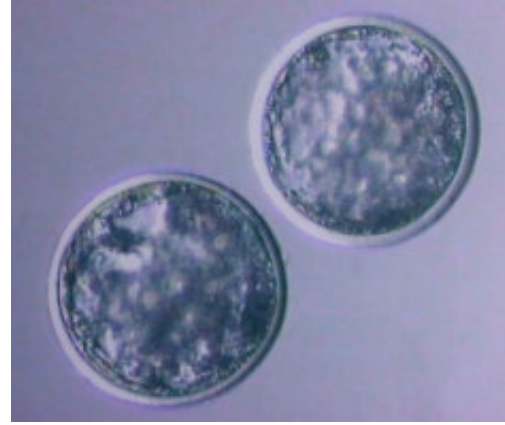
Çalışmada 3323 iyi kalite (A ve B kalite) oosit, embriyo elde edilme sürecine alınmış ve bunlardan 1993'ü ECS grubu için, 1330'u FCS grubu için kullanılmıştır.

Mature oositlerden, 2402 oosit fertilizasyon sürecine alınmıştır. Embriyo kültürünü takip eden 48. saatten sonra yapılan mikroskopik incelemelerde, iki ya da daha çok sayıda bölünen 1220 embriyo fertilize kabul edilmiştir. Bu oositlerin, embriyo kültür sürecine alınmalarını takip eden 168. saatte incelemede, 1220 embriyodan 194'ü morula-blastosist aşamasına gelmiştir (Resim 1-2).

Çalışma sonucunda, ECS grubunda ortalama %14; FCS grubunda ise ortalama %20 morula-blastosiste ulaşma oranı elde edilmiştir. Bu ortalamalar arasındaki farklılık, Tablo 6'da görüldüğü gibi istatistik olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.01). Serum katılım oranlarına göre en iyi sonuç %10 katılım düzeyinde elde edilmiştir. Ancak, serum katılım oranları arasında gözlenen farklılık ile serum katılım oranları ve serum çeşidi arasındaki etkileşim istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır (P>0.05) (Tablo 7).



Resim 1. Morula aşamasında bir embriyo



Resim 2. Blastosist aşamasında embriyolar

Tablo 6. Varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	Önemlilik
Serum çeşidi	1	0.15334	**
Serum katılım düzeyi	2	0.02621	-
Serum X Serum düzey etkileşimi	2	0.00689	-
Hata	153	0.02086	

\*\* : P&lt;0.01 - : P&gt;0.05

Tablo 7. Serum çeşitleri ve katılım oranlarına göre morula-blastosiste ulaşma oranları

Serum	Katılım Oranları (%)						Genel	
	%5		%10		%20			
	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$		
ECS	29	0.12±0.023	35	0.15±0.023	33	0.15±0.020	97	0.14±0.013 <sup>a</sup>
FCS	20	0.17±0.036	22	0.24±0.045	22	0.19±0.025	64	0.20±0.021 <sup>b</sup>
Genel	49	0.14±0.020	57	0.18±0.024	55	0.17±0.016		

a, b : P&lt;0.01 n : Çalışmada kullanılan mikrodamla sayısı

## TARTIŞMA VE SONUÇ

%10 FCS ve hormon katkılı maturasyon ortamı ile %20 ECS katkılı maturasyon ortamlarının karşılaştırıldığı çalışmalarında; FCS grubunda %39.4, ECS kullanılan grupta ise %22.7 morula-blastosist aşamasına ulaşma oranı elde eden Wiemer ve ark. (26), in vitro kültür sistemlerinin başarısının büyük oranda oosit seçim kriterleri ve maturasyon şartlarıyla ilgili olduğunu; iyi kalite oositlerin ve maturasyon ortamında hormon katkılarının kullanılmasının embriyo kültürüne olumlu etki

yaptığını kaydetmişlerdir. Araştırmacılar, normal koşullarda elde edilen ECS içerisinde bulunan biyolojik aktif maddelerin ısı inaktivasyonu veya dondurma işlemleri sonucunda etkilerinin kaybolabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Liu ve ark. (15), iki farklı ticari TCM-199 vasatı ile, %10 ECS veya %10 FCS katkılarının embriyo gelişimine etkisini inceledikleri çalışmalarında, ECS ile %6; FCS ile %10 ve %22 morula-blastosiste ulaşma

oranı elde etmişlerdir. Aynı çalışmada %6 ile %22 oranları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Araştırmacılar, FCS içerisinde gelişimi uyarıcı faktörler olduğunu aksine ECS içerisinde de embriyo-toksik etkide bazı immunglobulinlerin yer aldığını kaydederek, morula-blastosist olma oranları arasındaki bu farklılıkların sayılan nedenlerden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

İn vitro maturasyon ortamlarına katılan %20 ECS ve aynı oranda FCS'nin embriyo gelişimine etkisinin incelendiği çalışmada, Fukui ve Ono (6); her iki serum katkısı arasında blastosist oluşumu yönüyle fark saptamamışlardır. Buna göre ECS kullanılan grupta %7.2, FCS kullanılan grupta da %7.7 blastosist elde etmişlerdir. Thomas ve Siedel (24), %10 ECS ile yaptıkları çalışmada %37.0 oranında blastosist elde ederken; %20 oranında ECS kullanan Gliedt ve ark. (8), %3.6 oranında blastosist elde etmişler ve bu oranın, düşük maturasyon ve bölünme oranlarıyla ilgili olduğunu vurgulamışlardır. Maturasyon ortamında %10 FCS'nin kullanıldığı bir çalışmada, %13.0 blastosist elde edilmiştir (13). Benzer bir çalışmada %10 oranında FCS kullanan Takahashi ve ark. (22), %22.4 oranında blastosist elde etmişlerdir.

Bu araştırma, grup ortalamalarının FCS'nin ECS'ye üstünlüğü bakımından değerlendirildiğinde, Wiemer ve ark. (26) ve Liu ve ark.(15)'nin bulgularıyla büyük oranda uyumlu olduğu; her iki gruptaki blastosiste ulaşma oranı bakımından ise, Wiemer ve ark. (26), Thomas ve Siedel (24)'in bulgularından düşük kaldığı, bununla birlikte Fukui ve Ono (6), Kato ve Iritani (13) ve Gliedt ve ark. (8)'nin bulgularından yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmada morula-blastosist oranlarının, Wiemer ve ark. (26), Thomas ve Siedel (24)'in sonuçlarından düşük gerçekleşmesinin; seçilen kültür ortamları ve farklı kültür ortamı bileşimlerinden ileri geldiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, kaliteli oositlerin kullanılmasıyla tatminkar düzeyde sığır embriyosunun elde edilebileceği, mezbahadan toplanan ovaryumların oosit kaynağı olarak

laboratuvar şartlarında embriyo elde edilmesi amacıyla kolaylıkla kullanılabilceği kanısına varılmıştır.

Sunulan çalışmada, serum katılım düzeyleri bakımından %10 düzeyindeki katılımın diğerlerine göre farklılığı istatistik olarak anlamlı bulunmamakla birlikte en iyi sonucu verdiği görülmüştür. İn vitro sığır embriyosu üretiminde, maturasyon ortamına katılan FCS'nin ECS'ye göre önemli düzeyde morula-blastosist olma şansı sağladığı dolayısıyla in vitro maturasyon mediumuna FCS ilave edilmesinin ECS'ye göre daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Ancak, ECS'nin FCS'ye göre daha ekonomik olması nedeniyle inek oositlerinin in vitro maturasyonunu destekleyici bir unsur olarak kullanılabilceği düşünülmüştür.

#### KAYNAKLAR

1. **Ayoub MA, Hunter AG (1993)** *Parthenogenetic activation of in vitro matured bovine oocytes*. J. Dairy Sci., 76: 421-429.
2. **Bavister BD, Teresa ARH, Pinyopummintr T (1992)** *Development of in vitro matured / in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media*. Theriogenology, 37: 127-146.
3. **Birler S, Pabuçcuoğlu S, Atallah H, Aklan S, Özdaş ÖB, Bacmoğlu S, Cirit Ü, Zavar İ, Sönmez MEC, İleri İK (2002)** *İn vitro üretilen koyun embriyolarının transferi*. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 26: 1421-1426.
4. **Brackett BG, Zuelke KA (1993)** *Analysis of factor involved in the in vitro production of bovine embryos*. Theriogenology, 39: 43-64
5. **Fukui Y, Ono H (1988)** *In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilized bovine oocytes*. Vet. Record, 122: 282.
6. **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. Fert., 86: 501-506.
7. **Galli C, Lazzari G (1996)** *Practical aspects of IVM/IVF in cattle*. Anim. Reprod. Sci., 42: 371-379.
8. **Gliedt DW, Rosenkrans CF, Rorie RW, Rakes JM (1996)** *Effects of oocyte maturation land, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development*. J. Dairy Sci., 79: 532-535.

9. **Gordon I (1994)** *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cab international Co., Wallingford UK.
10. **Goto K, Iwai Y, Takuma Y, Nakanishi Y (1992)** *Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers*. J. Anim. Sci., 70: 1449-1453.
11. **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: 703-712.
12. **Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N (1995)** *Manual of Bovine Embryo Transfer*. National Livestock Breeding Centre press JLTA, Shirakawa, Japan.
13. **Kato H, Iritani A (1993)** *In vitro fertilization in cattle*. Molecular Reprod. Develop., 36: 229-231.
14. **Kojima T (1999)** *Embryo transfer (ET) in cattle - theory and practice*. National Livestock Breeding Centre Press, Shirakawa, Japan.
15. **Liu JM, Jin ZQ, Zhao XX, Zhu YD (1991)** *The development of bovine follicular oocytes matured in different culture media*. Veterinary Research Communications, 15: 257-260.
16. **Marquant BL, Humblot P (1998)** *Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine*. Theriogenology, 49: 3-11.
17. **Miyano T (1998)** *In vitro growth development of bovine oocytes*. Symposium on Molecular Bioengineering of Food Animals. 23-24 October 1998 Tokyo, Japan.
18. **Nagai T (1999)** *In vitro fertilization in cattle and pigs*. Tohoku National Agricultural Experiment Station Press, Iwate, Japan.
19. **Schellander K, Führer F, Brackett BG, Korb H, Schleger W (1990)** *In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplement with estrous cow serum*. Theriogenology, 33(2): 477-485.
20. **Shioya Y (1999)** *In vitro fertilization in cattle*. National Livestock Breeding Centre Press, Shirakawa, Japan.
21. **Takagi Y, Mori K, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J (1992)** *Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing*. J. Anim. Sci., 70: 1923-1927.
22. **Takahashi Y, Hishinuma M, Matsui M, Tanaka H, Kanagawa H (1996)** *Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere*. J. Vet. Med. Sci., 58 (9): 897-902.
23. **Tekeli T (1984)** *Investigations on in vitro fertilization of rabbit ova*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 31 (2): 186-196.
24. **Thomas WK, Siedel GE (1993)** *Effects of cumulus cells on culture of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro*. J. Anim. Sci., 71: 2506-2510.
25. **Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LEA (1977)** *Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits and cows*. J. Reprod. Fert., 51: 321-327.
26. **Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, Mc Kenna AI, Fick GH, Schultz GA (1991)** *Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos*. Molecular Reprod. Develop., 30: 330-338.